



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa  
de maduración y división pos fecundación *In vitro*, de  
ovocitos de alpaca procedentes de camal**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

**Rosario Lorenza CONDORI PACHECO**

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Condori, R. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división pos fecundación In vitro, de ovocitos de alpaca procedentes de camal [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2010.

---

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Hilaria y Jonás por haberme  
concedido la vida y haber dedicado parte  
de su tiempo en hacer de mí la persona que  
hoy en día sonrío.

A mi hermano Job, por alegrar cada minuto del  
día, desde que abrió los ojos y miró al mundo  
con inocencia y confianza.

A Dios, el ser que hizo nuestras vidas diferentes pero semejantes.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Wilfredo Huanca, por su apoyo incondicional  
a lo largo del proceso académico y sobre todo  
por su amistad, sencillez y dedicación para conmigo,  
a esa inmensa confianza que depositó en mi  
a la cual estoy muy agradecida.

A la memoria del Dr. Héctor Huamán, por su  
manera peculiar de compartir sus enseñanzas, su  
amistad y por aquella mirada sin necesidad de  
palabras.

A mis padres Jonás e Hilaria, por su espera, compañía  
y protección en muchas ocasiones hasta altas  
horas de la madrugada, por su apoyo y confianza  
en todo momento.

Al Dr. Pedro García, que gracias a su paciencia y  
amplio conocimiento me permitieron desarrollar  
con eficacia este trabajo.

A Miriam C, Martha V, que fueron parte  
clave de mi formación para la realización  
de ésta investigación.

Al Proyecto N° 064 – FINCyT – PIBAP – 2008  
“Desarrollo de protocolos de fertilización *in vitro* y  
criopreservación de gametos como herramientas  
para contribuir a la mejora genética de alpacas” por  
su valioso aporte económico en la ejecución de  
este proyecto.

A María, por su amistad y apoyo en la  
ejecución de la tesis; a Julia, Anali y Carolina  
por brindarme su amistad incondicional y ser parte  
de mi entorno; a William quien me enseñó el  
recorrido a Nuñoa y a Gianfranco por su ayuda  
en la culminación de la tesis.

A mis amigas Dorita Huaraya y Mary Quispe por  
su amistad, entusiasmo y alegría cuando eran mi  
compañía.

Al Alcalde del Camal Municipal de Nuñoa – Puno,  
por su apoyo y facilidad en la obtención de muestras.

Y también muchas gracias por su amistad y apoyo  
a los Drs. Antonio Ampuero, Francisco Suárez,  
José Camacho y Teodosio Huanca.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
<b>Abreviaturas</b>	<b>vii</b>
<b>Resumen</b>	<b>viii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>x</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Fisiología ovárica en camélidos.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Dinámica folicular en camélidos.....	3
2.1.2. Conducta sexual en camélidos.....	5
2.1.3. Ovulación en camélidos.....	6
2.1.4. Formación y regresión del cuerpo lúteo.....	8
<b>2.2. Maduración del ovocito.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Bases fisiológicas de la Maduración.....	9
2.2.2. Control de la maduración.....	15
<b>2.3. Maduración <i>In vitro</i>.....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Obtención de los ovocitos.....	19
2.3.2. Técnica de recogida de los ovocitos.....	20
2.3.3. Factores que afectan la calidad de los ovocitos.....	21
2.3.4. Selección de ovocitos.....	22
2.3.5. Factores que afectan la maduración .....	24
<b>2.4. Fecundación de los ovocitos.....</b>	<b>27</b>
2.4.1. Transporte de espermatozoides y fecundación.....	27
2.4.2. Bases fisiológicas.....	29
2.4.3. Factores que influyen sobre la eficiencia de la FIV.....	33
<b>2.5. Desarrollo embrionario.....</b>	<b>37</b>
2.5.1. Primeros estadios del desarrollo embrionario.....	37
2.5.2. División embrionaria y formación del blastocistos.....	37
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>

3.1. Lugar de estudio.....	38
3.2. Equipos y materiales.....	38
3.3. Composición y preparación de los medios.....	39
3.4. Obtención y clasificación de los ovocitos.....	40
3.5. Maduración <i>In vitro</i> .....	42
3.6. Tinción de ovocitos.....	44
3.7. Fecundación y cultivo <i>In vitro</i> .....	45
3.8. Análisis estadístico.....	47
 IV. RESULTADOS.....	 48
4.1. Tasa de maduración nuclear <i>In vitro</i> de ovocitos de alpacas, cultivados a diferentes tiempos.....	48
4.2. Tasa de división de ovocitos fecundados y con diferentes tiempos de maduración.....	49
4.3. Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos utilizados en Maduración <i>In vitro</i> de ovocitos de alpacas.....	51
 V. DISCUSIÓN.....	 52
 VI. CONCLUSIONES.....	 55
 VII. RECOMENDACIONES.....	 56
 VIII. LITERATURA CITADA.....	 57
 IX. APÉNDICE.....	 77



## ABREVIATURAS

BCB:	Azul de Cresol Brillante
BSA:	Bovine Serum Albumine
cAMP:	Adenosin Monofosfato cíclico
CEO:	Células del Epitelio Oviductal
CIV:	Cultivo <i>In vitro</i>
COCs:	Complejo cumulus ovocitos
eCG:	Gonadotropina Coriónica equina
FIO:	Factor Inductor de Ovulación
FIV:	Fecundación <i>In vitro</i>
FSH:	Hormona folículo Estimulante
GAGs:	Glucosaminaglicanos
GC:	Gránulos corticales
GnRH:	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
GV:	Germinal Vesicle
GVBD:	Germinal Vesicle Break Down
KSOM:	Medio optimizado de sulfato de potasio
LH:	hormona Luteinizante
M-I:	Metafase I
M-II:	Metafase II
MIV:	Maduración <i>In vitro</i>
MOET:	Ovulación múltiple y Transferencia embrionaria
MPF:	Maturation Promoting Factor
OMI:	Oocyte Meiosis Inhibitor
PGF2 $\alpha$ :	Prostaglandina F2 $\alpha$
PHE:	Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina
REL:	Retículo Endoplásmico Liso
RER:	Retículo Endoplásmico Rugoso
SPDF:	Male pronucleus development factor
TCM:	Medio de Cultivo Tisular
ZP:	Zona Pelúcida

## RESUMEN

El estudio fue realizado para evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la maduración nuclear y determinar la tasa de división de ovocitos madurados y fecundados a las 72 horas post fecundación. Complejos Cumulos–Ovocitos (CCOs) fueron obtenidos de ovarios procedentes de animales sacrificados y transportados al laboratorio en un termo conteniendo solución salina 0.9% suplementada con antibiótico antimicótico a 35°C. CCOs fueron aspirados de folículos  $\leq$  6mm. Previo a la evaluación en un estéreomicroscopio, 502 ovocitos fueron distribuidos en los 4 tiempos de Maduración: 30, 34, 38 y 42 horas, 533 ovocitos fueron cultivados y fecundados después de ser madurados a las 30, 34, 38 y 42 horas. CCOs con dos o más capas de células fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con 10% SFB, 0.5 $\mu$ g/mL de FSH, 10 $\mu$ g/mL de hCG, 0.2mM de Piruvato de sodio, 50 $\mu$ g/mL de gentamicina y 1 $\mu$ g/mL de estradiol, colocado en aceite mineral y cultivados a 39°C bajo una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y alta humedad. Después del tiempo de maduración, los ovocitos fueron removidos del medio y lavados con PBS suplementado con 10% de SFB y 1mg/ml de hialuronidasa y fijados en una solución de etanol: ácido acético (3:1). Ovocitos fueron colocados en una lámina y teñidos con 1% de orceína. Las láminas fueron examinadas bajo un microscopio de contraste de fases a 400X para evaluar el estado de maduración nuclear y clasificarlos como Metafase I (MI), Vesícula Germinal (VG), Anafase – telofase, Metafase II (MII) y degenerados. Para la fecundación, ovocitos fueron madurados bajo las mismas condiciones y fecundados con espermatozoides obtenidos de testículos procedentes de centros de sacrificio. Espermatozoides motiles fueron obtenidos por centrifugación a 700g bajo una gradiente de Percoll discontinua (22.5:45%) por 25 minutos. El sobrenadante fue removido y el pellet reconstituido con TL-Stock. Espermatozoides y ovocitos madurados fueron co-cultivados por 18 – 20 horas a 39°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo KSOM suplementado con 10% de SF, 2mM de piruvato de sodio y 50 $\mu$ g/mL gentamicina y evaluados a las 72 horas. En el experimento 1, la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de M-II fueron 26.3; 53.6; 62.6 y 74.4 % para las 30, 34, 38 y 42 horas de cultivo respectivamente, con diferencia estadística entre los G-I y II respecto al G-III y C-IV ( $p < 0.05$ ). En el experimento 2, las tasas de división fueron 9.5; 7.7; 15.4 y 19.2 para 30, 34, 38 y 42 horas de maduración después de 72 horas de cultivo. Estos resultados indican que es necesario de 38 a más horas de maduración *In vitro* de ovocitos de alpaca. Los resultados indican que se requiere de 38 a más horas para la maduración y fecundación *In vitro* de ovocitos de alpaca.

**Palabras claves:** Fecundación *In vitro*, ovocitos, maduración, alpacas

## ABSTRACT

The study was carried out to evaluate the effect of incubation time on nuclear maturation and determine the cleavage rate of alpaca oocytes after of 72 hours post fertilization. CCOs were collected from slaughterhouse ovaries and transported to the laboratory in a thermos flask containing a saline solution 0.9 % with antibiotic antimycotic at 35°C. CCOs were aspirated from follicles  $\leq 6$ mm and pooled in a conical tube to sedimentation. Previous to evaluation under stereomicroscope and only CCOs with a cytoplasm homogeneous and with 2 or more layers of cumulus cells were transferred to plates with 40 $\mu$ L drop of maturation medium TCM-199 supplemented with 10% FCS (v:v) plus 0.5 $\mu$ g/mL FSH, 10 $\mu$ g/mL hCG, 0.2mM Sodium Pyruvate, 50 $\mu$ g/mL Gentamicine and 1 $\mu$ g/mL Oestradiol under mineral oil with 10 – 12 oocytes/drop. Oocytes were incubated under the following maturation times: 30, 34 and 38 hours at 39°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and high humidity. After each maturation time, CCOs were removed from maturation medium and washed with PBS supplemented with 10% FCS and 1mg/ml of hyaluronidase and fixed in ethanol: Acetic acid (3:1). Oocytes were placed on the slide with minimum medium and stained with 1% Orcein. The slides were examined under a phase contrast microscope at 400x to evaluate status of nuclear maturation and classified as germinal vesicle (GV); metaphase I (M-I), Anaphase–Telophase; metaphase II (M-II) and degenerated. Experiment 2: The same maturation method that exp.1 was used. Testes were collected of mature males from slaughterhouse and transported to the laboratory. Caudal epididymide was isolated. A prick was made on the convoluted tubules with a sterile hypodermic needle and the fluid, rich in spermatozoa, was aspirated in syringes containing 2 ml of TRIS-Fructose egg yolk extender. Motile spermatozoa were obtained by centrifugation: 700g on a Percoll discontinuous gradient (22.5:45%) for 25 min. The supernatant was removed by aspiration and pellet (containing viable spermatozoa) was resuspended in TL Stock. Spermatozoa and oocytes were co-incubated for 18–20 h at 39°C with 5%CO<sub>2</sub> and then cultivate in KSOM supplemented with 10% FCS (v:v), 0.2mM Sodium Pyruvate and 50 $\mu$ g/ml Gentamicine and evaluated at 72 hours. In experiment 1, the proportions of oocytes reaching M-II stage was 26.3; 53.6; 62.6 y 74.4% to the 30, 34, 38 and 42 hours of culture respectively, with difference to maturation time ( $p < 0.05$ ) between GI and GII respect to GIII and GIV. In experiment 2, the cleavage rate was 9.5; 7.7; 15.4 and 19.2 % to 30, 34, 38 and 42 hours after 48 hours culture. These results indicate that is required 38 or more hours for the maturation and fertilization of alpaca oocytes

**Key words:** *In vitro* Fertilization, oocytes, maturation, alpaca.

**LISTA DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Tasa de Maduración Nuclear de ovocitos.	49
<b>Cuadro 2.</b> Tasa de división de ovocitos pos fecundación.	49
<b>Cuadro 3.</b> Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos	51

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Diseño experimental	43
<b>Figura 2.</b> Estadio Metafase I	50
<b>Figura 3.</b> Estadio Metafase II	50
<b>Figura 4.</b> División de cigotos a las 72 horas.	50

## **I. INTRODUCCION**

El conocimiento sobre la fisiología y endocrinología reproductiva de las especies domésticas ha tenido un incremento sustancial en los últimos años y este conocimiento ha contribuido al desarrollo de procedimientos biotecnológicos aplicados a las distintas especies. De otro lado, la disponibilidad de estos procedimientos ha permitido mejorar el conocimiento sobre aspectos poco conocidos del desarrollo embrionario temprano y contribuir en el progreso genético, con la obtención de un mayor número de crías procedentes de padres genéticamente superiores y la reducción del intervalo generacional (Kruip y Van Reenen, 2001).

La producción de embriones, a partir de ovocitos procedentes de animales vivos mediante punción de ovarios guiada vía transvaginal o de ovarios procedentes de centros de sacrificio, que pueden ser madurados, fecundados y cultivados en el laboratorio; ha permitido un incremento de la producción de embriones (Hashimoto, 2009). Desde el nacimiento del primer ternero obtenido por Fecundación *In vitro* (FIV) (Brackett y col, 1982), se ha realizado un considerable avance en los procedimientos para la producción de embriones de bovinos en el laboratorio. El desarrollo de la técnica de FIV es el resultado de investigaciones sobre los factores involucrados en la maduración del ovocito, capacitación del espermatozoide y el desarrollo embrionario posterior a la FIV; según lo señala Brackett y col, (1982). Las diferencias en el desarrollo de la técnica para diferentes especies, se explica, porque no siempre es posible utilizar los mismos procedimientos, debido a las características propias de cada especie.

Los camélidos sudamericanos domésticos, alpacas y llamas, son especies de gran importancia para la población alto andina y se encuentran distribuidas en las zonas altas de

Perú, Bolivia, Argentina y Chile; sin embargo los índices reproductivos son deficientes, con una tasa de natalidad menor al 50 % y un largo intervalo generacional (Novoa, 1996). Los esquemas de manejo con cruzamientos no programados, contribuyen a que la producción de fibra, uno de sus principales recursos, represente sólo un 8% con características de finura aceptables para la industria (Freyre, 2006).

La aplicación de tecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos se ha incrementado en la última década (Miragaya y col, 2006). El conocimiento de la biología reproductiva de los camélidos ha contribuido al desarrollo y aplicación de las tecnologías reproductivas pero en forma limitada y referidas principalmente a desarrollar la técnica de Inseminación Artificial con semen fresco (Huanca y Adams, 2007), sincronización y estimulación de la onda folicular, desarrollo de protocolos de estimulación ovárica y transferencia de embriones (Ratto y col, 2003; Huanca y col, 2009); experiencias preliminares sobre Maduración y Fecundación *In vitro* (Del Campo y col, 1994; Miragaya y col, 2006; Conde y col, 2007).

La escasa información existente sobre el desarrollo de la Fecundación *In Vitro* en camélidos domésticos, requiere en una primera fase, estudiar y evaluar los diversos factores que contribuyan a la obtención de resultados similares a los observados en otras especies de interés económico, como el tiempo de almacenamiento y transporte de ovarios hasta el laboratorio; tiempo y condiciones de Maduración, Fecundación y Cultivo *In Vitro* y obtención de ovocitos madurados *In vivo*, por lo que el presente estudio se ha desarrollado con el propósito de evaluar las condiciones requeridas para la Maduración *In Vitro* de ovocitos obtenidos de ovarios procedentes de centros de sacrificio, en base a los objetivos siguientes:

- a) Determinar los tiempos de maduración requeridos para obtener ovocitos en estadios de metafase II.
- b) Determinar la tasa de división de ovocitos madurados y fecundados a las 72 horas post fecundación.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Fisiología ovárica en camélidos**

#### **2.1.1. Dinámica folicular en camélidos**

El crecimiento folicular, con la presencia de folículos con un diámetro superior a los 5mm, ha sido reportada bajo condiciones naturales en hembras de 8 meses de edad, similar a la actividad prepuberal reportada en bovinos, pero sin ser receptivas al macho, conducta que recién se presenta entre los 12 á 14 meses, por su receptividad sexual al macho (Novoa y col. 1972; Sumar, 1985). Sin embargo, aun cuando existe conducta de receptividad, las hembras son expuestas al macho cuando el animal alcanza el 60% del peso corporal de un adulto, equivalente a unos 33 – 36Kg (Sumar, 1985; Smith, 1985). Si bien se considera que el inicio de la receptividad sexual está relacionado con la edad y condiciones nutricionales, los folículos presentes en el ovario parecen ser sensibles a la estimulación hormonal, habiéndose observado una respuesta positiva, a la aplicación exógena de la hormona Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en alpacas hembras de 6 meses de edad, con el crecimiento de folículos mayores a 7mm (Huanca y col, 2003), sugiriendo la sensibilidad ovárica a los estímulos exógenos.

Los camélidos son clasificados como especies de ovulación inducida (San Martin y col. 1968) y ante la ausencia de cópula, presentan un desarrollo folicular en ondas de forma continua, según ha sido descrito en llamas (Bravo y Sumar, 1989; Adams, 1990; Bravo *et al*, 1990; Chaves *et al*, 2002); alpacas (Vaughan *et al*, 2004); y vicuñas (Agüero *et al*, 2001). En alpacas, el reclutamiento o emergencia de una onda folicular se caracteriza por el crecimiento de 8 á 10 folículos mayores a 3mm (Vaughan y col, 2004) o de 5 á 11 folículos de 4mm (Bravo y Sumar, 1989), continuando con la fase de selección que permite observar el crecimiento de 1 á 3



foliculos mayores 5mm (Adams y col, 1989), hasta la presencia de un folículo dominante, con un diámetro mayor o igual a 7mm, según ha sido descrito en llamas y alpacas (Adams, 1990; Vaughan *et al*, 2004, Cervantes y col, 2007) y al no existir ovulación por la ausencia de cópula, el folículo dominante tiende a sufrir atresia (Sumar, 2000), por lo que no es adecuado utilizar el término de ciclo estral. El folículo dominante inhibe el crecimiento de otros folículos posiblemente por la secreción de factores inhibitorios como la inhibina (Tibary, 2001).

El desarrollo folicular presenta variaciones en la tasa de crecimiento entre las diferentes especies de camélidos, habiéndose reportado un crecimiento de 0,5 - 0,8mm/día en llamas (Adams y col, 1989); 0,4mm/día en alpacas (Vaughan y col, 2004) y 1,8mm/día en vicuñas (Agüero y col, 2001; Miragaya y col, 2004). Una onda folicular puede ser dividida en tres fases: a) fase de crecimiento a partir de folículos con más de 4mm, b) fase estática o de mantenimiento con folículos dominantes iguales o mayores a 7mm y c) fase de regresión con folículos de igual tamaño que en la fase estática, pero que al no culminar en ovulación, tienden a disminuir y una duración de 4 días por cada una de las fases (Bravo y col, 1990). En llamas se reporta una fase de crecimiento de 4,8 días, fase estática de 5,0 y fase de regresión de 4 días (Bravo y col, 1990). El intervalo entre la emergencia de una onda y la siguiente, es variable según la condición fisiológica de las hembras, reportándose que llamas no expuestas al macho presentan un intervalo de 20 – 25 días; en tanto que llamas expuestas a machos vasectomizados, para inducir ovulación sin gestación, tienen intervalos de  $19.8 \pm 0.7$  y llamas gestantes presentan intervalos de  $14.8 \pm 0.6$  días (Adams y col, 1989). En alpacas, aun cuando se ha reportado un intervalo promedio de 15 días, entre dos ondas foliculares (Bravo y Sumar, 1989), un estudio reciente sugiere una variación individual entre 12 á 16 días (Vaughan y col, 2004).

En alpacas, los folículos dominantes alcanzan un diámetro máximo en un rango de 8 á 12mm (Bravo y Sumar, 1989; Vaughan y col, 2004), en llamas puede llegar a alcanzar entre 9 á 16mm (Adams, 1990) y en vicuñas se reporta tamaños variables entre 6 á 11mm (Miragaya y col, 2004).

Durante la fase de crecimiento y dominancia folicular, se ha establecido una correlación positiva entre el tamaño del folículo dominante y las concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol y urinarias de sulfato de estrona en alpacas (Aba y col, 1995; Bravo y col, 1990) y en llamas (Aba y col, 1995; Bravo, 1994; Chaves y col, 2002), con los perfiles más elevados de estradiol en el momento que el folículo alcanza su máximo desarrollo, a los 8 días post inicio de la onda de crecimiento folicular en alpacas (Vaughan y col, 2004) y los 10 á 13 días en llamas

(Chaves y col, 2002). Los niveles plasmáticos de progesterona tienden a presentar valores basales inferior a 1ng/ml (Aba y col, 1995; Bravo y col, 1990). En llamas y alpacas no se ha demostrado la existencia de una asociación entre los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) y el inicio de la onda de crecimiento folicular, como si ha sido descrito en bovinos (Adams y col, 1999).

Los folículos dominantes se distribuyen de forma homogénea y alternada en ambos ovarios (Adams y col, 1992; Bourke y col, 1992; Bravo y col, 1990; Vaughan y col, 2003) e independiente del lugar donde se encuentran los folículos dominantes y la posterior ovulación y formación del cuerpo lúteo, no se han registrado diferencias en la tasa de preñez (Cervantes y col, 2007), aun cuando el 98% de las gestaciones se localizan en el cuerno izquierdo (Fernández - Baca y col, 1973; Bravo y Varela, 1993).

#### **2.1.2. Conducta sexual en camélidos**

La conducta sexual de una hembra durante la etapa de receptividad sexual puede ser dividida en cortejo y monta. La fase de cortejo, iniciada al contacto entre un macho sexualmente activo con una hembra, tiene una duración variable, dependiente de la libido y fortaleza del macho, desde unos segundos hasta los 10 minutos y culmina al producirse la aceptación o rechazo del macho (England y col, 1971). Una hembra receptiva adopta una posición de decúbito esternal en presencia del macho o en las proximidades de una pareja que está copulando, formándose en ocasiones grupos de hembras en posición decúbito esternal (Fernández - Baca y col, 1970a; Novoa, 1970), incluso algunas hembras llegan a montar a otras, ejecutando movimientos pélvicos similares a los machos (San Martin y col, 1968; Fernández Baca y col, 1970a) pero sin ser suficiente para inducir la ovulación (Fernández - Baca y col, 1970b). Durante la cópula, los machos muestran su excitación con movimientos de las orejas y cola, dilatación de los orificios nasales y la emisión de sonidos guturales denominados “orgling” (Novoa, 1970), sugiriéndose que estos sonidos pueden inducir a la descarga preovulatoria de LH (Bravo y col, 1994; Guilbride y Moro, 1965). Una hembra no receptiva, al ser perseguida por un macho, trata de escapar por todos los medios y se defiende pateando y escupiendo (Fernández - Baca y Novoa, 1968); sin embargo debido a la agresividad de los machos muchas veces llegan a aceptar la cópula.

La presencia de un folículo  $\geq 7\text{mm}$ , determina la conducta de receptividad al macho (Adams *et al*, 1990; Vaughan *et al*, 2004), y está relacionado con el estadio de desarrollo folicular, fase de crecimiento o estático y regresión, al momento de la monta (Cervantes *et al*, 2007; Vaughan *et al*, 2004; Bravo *et al*, 1991). Los folículos en fase de regresión, si bien mantienen la conducta de receptividad y su capacidad de ovulación, posiblemente pueden ser considerados como uno de los factores relacionados con las pérdidas embrionarias tempranas, porque producen ovocitos en estadios de maduración avanzados o con cambios cualitativos, manifestándose en una menor tasa de gestación (Sumar J, comunicación personal, Cervantes *et al*, 2007).

### **2.1.3. Ovulación en camélidos**

En bovinos, una vez que el folículo dominante ha alcanzado un tamaño pre-ovulatorio y no existe efecto inhibitorio de la progesterona circulante secretada por un cuerpo lúteo, se produce la ovulación. En alpacas se requiere del estímulo de la cópula para inducir la ovulación (England y col, 1969; Fernández - Baca y col, 1970; San Martín y col, 1968). El incremento de los perfiles de estradiol, asociado con el crecimiento folicular, no parece ser suficiente para inducir la descarga pre - ovulatoria de LH (Bravo y col, 1990), aún cuando se ha reportado que la presencia de estímulos auditivos, visuales, olfatorios puede inducir la ovulación entre el 5 – 10% y que por lo general está asociada al periodo post parto (Fernández - Baca y col, 1970; Bravo y col, 1989; Sumar, 1996).

La secreción preovulatoria de LH se produce entre las 2 a 3 horas después del inicio de la cópula o administración exógena de GnRH y disminuye entre las 5 a 12 horas después del tratamiento (Bravo y col, 1992; Aba, 1998; Aba y Forsberg, 1995), sin que se haya determinado un incremento de la descarga de LH ante una repetición de cópulas en un intervalo de 6 a 24 horas (Bravo y col, 1992), sugiriendo un periodo refractario atribuido a una disminución del número de receptores hipofisarios a la GnRH o de las células hipofisarias para la LH. La secreción de LH como respuesta a la cópula, está relacionada con el tamaño del folículo presente en el ovario (Bravo y col, 1991) y folículos con un diámetro de 4 a 5 mm, no inducen una secreción de LH suficiente para inducir ovulación, sugiriéndose que folículos pequeños no producen suficiente cantidad de estradiol para sensibilizar el eje hipotálamo – hipofisario (Bravo y col, 1991).

Estudios recientes han determinado que la ovulación en alpacas y llamas se produce por la deposición, durante la cópula, de un componente proteico presente en el plasma seminal y que ha sido denominado Factor Inductor de Ovulación (FIO) (Adams y col, 2005; Ratto y col, 2005; López y col, 2006), similar al componente reportado en el camello bactriano (Chen BX y col, 1985). El FIO induce la ovulación en alpacas y llamas mediante una acción sistémica, al ser aplicada vía intramuscular y ante la presencia de un folículo dominante  $\geq 7\text{mm}$  (Adams y col, 2005; Ratto y col, 2005; Panez y col, 2009). La ovulación no es inducida directamente por la acción mecánica de la cópula y la estimulación de las terminaciones nerviosas, como ocurre en especies de ovulación inducida (Ratto y col, 2005) y aún cuando no se conoce el mecanismo exacto se sugiere, que las características de una cópula intracornual, con una duración entre 8 a 50 minutos, va a producir una inflamación de las paredes uterinas y posiblemente contribuya a la absorción y transporte del FIO hacia el hipotálamo o hipófisis, para estimular la secreción pulsátil de LH. El estradiol no desempeña un rol clave en la secreción pulsátil de LH, como sucede en las especies de ovulación inducida (Bakker y Baum, 2000) y su rol parece estar orientado a la conducta de receptividad de la hembra.

Los estudios sobre la composición del FIO sugieren que es una molécula proteica diferente a la hormona liberadora de gonadotropinas, con un peso molecular de 30KDa (Vásquez y col, 2007; Ratto y col, 2010), resistente al calor y que no es inactivada frente a la acción enzimática de enzimas, proteinasa, sugiriendo su potente acción biológica (Ratto y col, 2010). El FIO tiene una acción luteotrópica superior a la determinada por la aplicación de hormona GnRH, contribuyendo a la formación de un cuerpo lúteo con un tamaño promedio de  $13.5 \pm 0.2\text{mm}$  respecto a los  $11.5 \pm 0.5\text{mm}$  determinado por la inducción con GnRH y una mayor producción de progesterona (Adams y col, 2005).

El intervalo de tiempo que transcurre entre el estímulo y la ocurrencia de la ovulación en alpacas y llamas, presenta un promedio de 30 horas, independiente de la inducción por la cópula o estímulo hormonal exógeno y determinada por ecografía (Ratto y col, 2006; Huanca y col, 2001; Adams y col, 1990), aún cuando se reporta un rango de 24 a 48 horas en alpacas (San Martín y col, 1968).

En los camélidos, igual que en los mamíferos, los pulsos preovulatorios de LH son claves para que ocurra la maduración del folículo, alterando la estructura y funcionalidad del folículo y contribuyendo a la maduración del ovocito, con la expansión de las células del cúmulo y finalmente la ruptura de la pared folicular (Khatir y col, 2004). La ovulación

espontánea, definida por la desaparición de un folículo previamente determinado, en ausencia del estímulo de la cópula o estímulo hormonal, puede ser observado en un 3 á 5% de hembras receptivas y es atribuido al contacto físico con macho, manejo, manipulación del tracto genital e incluso por la ecografía transrectal (Bourke y col, 1995; Chaves y col, 2002; Ratto y col, 1997; Sumar, 1996).

#### **2.1.4. Formación y regresión del cuerpo lúteo**

Posterior a la ovulación, se inicia la reorganización de la teca y granulosa para la formación del cuerpo lúteo, que puede ser observado entre los 2 á 4 días post copula (Adams y col, 1989, Adams, 1990; Sumar y Bravo, 1991; Ratto y col, 2003). El desarrollo del cuerpo lúteo se acompaña de un incremento de los niveles de progesterona, los cuales son detectables a partir del día 4 (Aba y col, 1995; Sumar y García, 1986), con niveles plasmáticos superiores a 0.32 ng/ml (1 nmol/l) (Sumar y col, 1988). El cuerpo lúteo alcanza su máximo tamaño, entre 10 á 15mm, a los 8 días, siempre correlacionado con el nivel de progesterona detectada superior a 4 –5 ng/m (Aba y col, 1995; Adams y col, 1991). La descripción de fases luteales cortas de 4 días de duración (Sumar y col, 1988) ha sido atribuida a folículos anovulatorios luteinizados (Bravo y col, 1991). La existencia de un cuerpo lúteo no afecta las ondas de crecimiento folicular, observándose a las 2 días la emergencia de una nueva onda (Adams y col, 1990, Ratto y col, 2003), sin embargo el número de folículos en crecimiento y el diámetro alcanzado por el folículo dominante tiende a ser menor (Adams y col, 1990).

En hembras no gestantes, el cuerpo lúteo tiene una vida media corta de 8 á 9 días, iniciando su regresión y disminución del diámetro a los 12 días, correlacionada con un descenso de la secreción de progesterona hasta alcanzar niveles basales a los 14 ó 15 días (Adams y col, 1989; 1990; 1992b; Fernández-Baca y col, 1970a; Sumar y Bravo, 1991; Sumar y col, 1988a). La regresión del cuerpo lúteo se origina por la secreción endometrial de PGF2 $\alpha$  que llega a la circulación sistémica a través de las venas uterinas (Aba y col, 2000). Existen diferencias en la acción luteolítica de ambos cuernos uterinos, reportándose que el cuerno izquierdo tiene un efecto luteolítico local y sistémico mientras que el cuerno derecho solo tiene efecto luteolítico local, afectando al ovario derecho (Fernández-Baca y col, 1979). Esta diferencia en la actividad luteolítica ha sido relacionada con la anatomía vascular del útero, el oviducto y los ovarios, observándose que en el 90% de las hembras la arteria uterina derecha es más gruesa y presenta ramificaciones que irrigan el cuerno izquierdo, mientras que la vena uterina izquierda presenta

un diámetro superior, sugiriendo la existencia de conexiones arteriovenosas que permiten al cuerno izquierdo influir sobre la actividad funcional del ovario derecho (Del Campo y col, 1996).

Los cambios en la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  han sido analizados, basados en la concentración de sus metabolitos más estables (PGFM, 3,14 dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_2\alpha$  o 15-ceto-dihidro- $\text{PGF}_2\alpha$ ) (Aba y col, 2000; Skidmore y col, 1996a; 1998). Las concentraciones de PGFM presentan niveles basales (200pmol/l) durante el inicio de la fase luteal y tienden a elevarse a los 7 días post cópula (Aba y col, 2000), llegando a aumentar la amplitud de los pulsos (800 – 1200pmol/l en llamas y 600pmol/l en alpacas) entre los 8 á 12 días (Aba y col, 1995b; 2000; Sumar y col, 1988).

## **2.2. Maduración del Ovocito**

### **2.2.1. Bases fisiológicas de la Maduración**

#### **2.2.1.1. Ovogénesis y Foliculogénesis**

En la mayoría de mamíferos, los gametos (ovocitos y espermatozoides) se originan mediante el proceso conocido como gametogénesis. Durante la vida embrionaria las gónadas se desarrollan como dos eminencias o protuberancias a lo largo de la porción ventral del mesonefros, denominados pliegues o crestas genitales o gonadales. Las células germinales primordiales, que se originan en la pared del saco vitelino cerca del alantoides, emigran por movimientos ameboides siguiendo el mesenterio dorsal del intestino posterior alcanzando la gónada indiferenciada. En la gónada genéticamente femenina, estas células penetran en el mesénquima subyacente, rodeadas de cúmulus celulares aislados diferenciándose en ovogonias (Sadler, 1996; Van Den Hurk y col, 1997).

En los mamíferos las células germinales primordiales, al igual que las ovogonias, entran en un período de actividad mitótica que se completa generalmente durante la vida fetal en los rumiantes (Hirshfield, 1991; revisado por Van Den Hurk y col, 1997), mientras que en otras especies como el hámster, conejo, gato y cerdo se prolongan hasta después del nacimiento. Tras completar las divisiones mitóticas, las ovogonias se transforman en ovocitos primarios al entrar en el proceso de meiosis. Estas células se bloquean en el diplotene (dictiotene) de la profase de

la primera división meiótica. Poco después de su formación, los ovocitos primarios se rodean de una capa de células planas, constituyendo así un folículo primordial, localizados en una posición más cortical dentro del ovario (revisado por Van Den Hurk y col, 1997).

De la reserva de folículos primordiales, formados durante la vida fetal o poco después del nacimiento, algunos comienzan a crecer gradual y sucesivamente durante toda la vida o cuando menos hasta dicha reserva se agota.

Con la activación e inicio de la foliculogénesis, el folículo primordial adquiere una capa cuboidal de células de la granulosa y se le denomina entonces folículo intermedio, para luego transformarse en folículo primario; esta transformación y posterior crecimiento del folículo puede ocurrir en cualquier momento de la vida de la hembra de los mamíferos, desde el periodo fetal, durante la pubertad, gestación hasta finalizar el período reproductivo (Gordon, 1994).

La multiplicación de las células de la granulosa origina varias capas de células alrededor del ovocito, denominándose así, folículos secundarios. Durante esta etapa de crecimiento del folículo, se forma, la zona pelúcida (ZP), una cubierta glicoproteica entre el ovocito en crecimiento y la capa más interna de las células de la granulosa, también se disponen fibras de tejido conectivo paralelas a la membrana basal, ubicada por debajo de la granulosa para formar la teca, que al final del período, está constituida además por una red capilar y células epiteliales que producen hormonas. Finalmente el folículo secundario se transforma en folículo terciario con la aparición de la cavidad antral.

#### **2.2.1.2. Activación folicular, crecimiento y maduración del ovocito**

Con el inicio del desarrollo folicular, se producen en el ovocito una serie de cambios fisiológicos que lo capacitan para la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Leibfried – Rutledge y col, 1987). Este proceso puede dividirse en dos fases: crecimiento y maduración del ovocito. Éstas coinciden aproximadamente con el inicio de dos etapas de desarrollo folicular, la primera se inicia con la foliculogénesis y su duración es bastante larga, mientras que la fase de maduración se inicia tras el estímulo de folículo dominante por el pico de LH preovulatorio, que desencadena la maduración en el ovocito e induce a nivel del folículo un aumento de la actividad proliferativa de las células de la granulosa y una acumulación de líquido folicular (Baker, 1982). Esta fase concluye con la ovulación y su duración es mucho más corta.

Durante la fase de maduración en el núcleo del ovocito finaliza el primer bloqueo meiótico en estado de vesícula germinal (VG) y la meiosis evoluciona hasta alcanzar la metafase II (ovocito secundario). La meiosis queda bloqueada por segunda vez en este punto, y sólo se completara en el caso que el ovocito sea fecundado (Baker, 1982).

La maduración incluye no sólo cambios nucleares, sino también cambios en el citoplasma, zona pelúcida, metabolismo del ovocito, y células foliculares que lo rodean.

#### **2.2.1.2.1. Maduración nuclear**

En el ovocito, la maduración del núcleo es un proceso necesario que le permite reducir la carga cromosómica de la especie exactamente a la mitad, convirtiéndose en una célula haploide, así, cuando los dos gametos (ovocito maduro y espermatozoide) se fusionan en la fecundación, se restablece el número diploide de cromosomas en el embrión.

Al inicio de la fase de maduración, el núcleo del ovocito primario (inmaduro), se encuentra bloqueado en la profase (dictiotene) de la primera división meiótica, estadio de vesícula germinal (germinal vesicle, GV). Tras alcanzar la madurez sexual y en respuesta a la elevación preovulatoria de la hormona luteinizante (pico LH), el ovocito primario del folículo dominante reinicia el proceso de división meiótica (Gordon, 1994). El núcleo del ovocito entra en diacinesis, y al final de la profase I se disgrega la envoltura nuclear y ocurre la ruptura de la vesícula germinal (germinal vesicle break down, GVBD). Al mismo tiempo se produce una polimerización de los microtúbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la metafase I. los ovocitos carecen de centriolos en los extremos del huso, en lugar de éstos, se encuentra un material pericentriolar constituyendo los “centros organizadores de microtúbulos”.

Tras la metafase I, el ovocito entra rápidamente en anafase I y la telofase I, se separan los cromosomas homólogos y se produce la extrusión del primer corpúsculo polar, se reduce el número de cromosomas a la mitad y se origina el ovocito secundario. Esta nueva célula es de mayor tamaño (más citoplasma) que el primer corpúsculo polar, debió a la posición excéntrica del núcleo del ovocito y a la dirección adoptada por el eje del huso meiótico.



A diferencia de la profase I, que es muy larga, la profase II, prácticamente no existe y el ovocito secundario comienza la segunda división meiótica, entrando directamente a la metafase II, en este momento la meiosis se interrumpe nuevamente (segundo bloqueo) y el ovocito es ovulado. La segunda división meiótica termina cuando el ovocito es penetrado por un espermatozoide y se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar.

#### **2.2.1.2.2. Maduración citoplasmática**

La maduración del ovocito implica además de los cambios nucleares, otra serie de cambios a nivel del citoplasma y de sus membranas, que aunque no son tan evidentes, poseen una gran influencia sobre la fecundación y futura capacidad de desarrollo de los ovocitos.

Durante la Maduración *In vitro* (MIV), se ha observado que ovocitos liberados de los folículos antrales (no necesariamente folículos dominantes), y colocados en medios adecuados de maduración, que con frecuencia incluyen gonadotropinas (FSH, LH) y suero sanguíneo, son capaces de completar la maduración nuclear espontáneamente, similar a los eventos que ocurren *In vivo* (Edwards, 1965; Hunter y col, 1972; Thibault, 1977; citados por Suzuki y col, 1994). Sin embargo, la Fecundación *In vitro* (FIV) de estos ovocitos y el posterior desarrollo embrionario han resultado menos eficientes al compararlos con aquellos madurados *In vivo* (Greve y col, 1987; Leibfried – Rutledge y col, 1987; Thibault y col, 1987). Estos hallazgos han sugerido que la maduración nuclear no es suficiente y que los ovocitos requieren de un proceso de maduración citoplasmática para lograr una fecundación y desarrollo embrionario normal (Ball y col, 1983; Fukushima y Fukui, 1985; Mermillod y col, 1999).

La maduración citoplasmática puede definirse como una serie de cambios a nivel citoplasmático que le confieren al ovocito maduro la habilidad para que se produzca la correcta descondensación de la cromatina del espermatozoide y la posterior formación de los pronúcleos tras la penetración espermática, así como también la adquisición de competencia citoplasmática para soportar el desarrollo embrionario temprano (Prather y Day, 1998; Mermillod y col, 1999).

La maduración citoplasmática del ovocito está formada por dos fases (Gordon, 1994):

- a) Una fase inicial inductiva, que dura hasta la GVBD, durante la cual parece producirse una reorganización de los elementos somáticos del folículo (células del cúmulus, etc.), y en la cual los cambios estructurales y sintéticos son muy pocos.

- b) Una fase de síntesis, que ocurre posterior a la fase inductiva, donde la mayoría de los componentes del ovocito se organizan.

Se ha reportado que durante el período que transcurre entre la GVBD y la metafase II, se sintetizan varios factores indispensables para lograr una fecundación normal. En este sentido se han mencionado el factor de crecimiento del pronúcleo masculino (male pronucleus development factor, SPDF) (Yanagimachi, 1981).

Durante la maduración citoplasmática del ovocito se producen una serie de cambios importantes a nivel estructural y molecular que se han estudiado detalladamente en bovinos (Kruip y col, 1983) y en ovinos (Moor y Gandolfi, 1987). Cuando el ovocito se encuentra en el estadio de VG, posee un citoplasma ocupado por vesículas y elementos del retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias ubicadas en la periferie. Durante la GVBD el RER desaparece y se forma agregados de mitocondrias, gotas de lípidos y cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) denominadas “unidades metabólicas”. Al final de la maduración, estos agregados se distribuyen homogéneamente por el citoplasma y la mayoría de los orgánulos toman una posición en el centro del ovocito, excepto los gránulos corticales (GC) que migran y se sitúan inmediatamente debajo de la membrana plasmática del ovocito. La localización periférica de estos orgánulos y la correcta exocitosis de su contenido hacia el espacio perivitelino es un evento fundamental durante la fecundación, para evitar la penetración poliespérmica en los ovocitos mamíferos (Moor y Gandolfi, 1987; Yanagimachi, 1994; Damiani y col, 1996). Otros cambios observados durante la maduración, es la formación y el ensanchamiento del espacio perivitelino y la reordenación de la unidades metabólicas en ovocitos bovinos ovulados (Hyttel y col, 1986 a, b).

Durante la maduración citoplasmática se producen también cambios en la actividad metabólica del ovocito, de hecho aumenta el metabolismo oxidativo a lo largo del proceso (Rieger y Loskutoff, 1994). Asimismo, ocurren cambios en la síntesis de proteínas y modificaciones transcripcionales de las mismas (Moor y Gandolfi, 1987). La reprogramación de la síntesis proteica tras GVBD es esencial para alcanzar la maduración meiótica, adquirir la capacidad de descondensar el núcleo del espermatozoide que lo fecunda y el posterior desarrollo de los pronúcleos. La formación de los pronúcleos tras la fecundación requiere la prolongación de la síntesis de proteínas por lo menos hasta el estadio temprano de metafase II (Ding y col, 1992), así como también, para el desarrollo de un embrión normal, puesto que existen

evidencias que demuestran que algunas proteínas sintetizadas durante la maduración, permanecen en los primeros estadios de desarrollo embrionario (Moor y Gandolfi, 1987).

#### **2.2.1.2.3. Maduración de la Zona Pelúcida**

La zona pelúcida (ZP) es una envoltura externa, localizada entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa, es secretada por el ovocito en crecimiento y su composición es específica de cada especie. La ZP está constituida principalmente por glucoproteínas, pero también posee polisacáridos, mucopolisacáridos y otras proteínas (Hafez, 1993; revisado por Betteridge, 1995). Estructuralmente la ZP, tiene una apariencia fibrosa, similar a una esponja, y a pesar de su compleja apariencia, en la mayoría de las especies está compuesta por 3 tipos de glucoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 (Harris y col, 1994; Briggs y col, 1999).

La zona pelúcida es responsable de la inducción de la reacción acrosómica en el espermatozoide, intermediaria en la especificidad de especie durante la interacción de los gametos (O'Rand, 1988), previene la poliespermia tras la fecundación, bloqueando la penetración del ovocito por más de un espermatozoide (Crozet y Dumont, 1984) y protege al embrión en desarrollo previo a la implantación (Modlinski, 1970; citado por McLeskey, 1998).

Aunque la ZP se sintetiza durante la fase de crecimiento del ovocito, la capacidad para ser reconocida, inducir la reacción acrosómica y ser penetrada por el espermatozoide, se adquiere posteriormente, hacia los estadios finales de la maduración del ovocito (revisado por Thibault y col, 1987).

La maduración de la zona pelúcida implica cambios en su estructura, uno de esos cambios, es el desarrollo de numerosos poros en su cara externa, los cuales son llenados con proteoglicanos secretados por las células del cumulus, éstos ayudarán al espermatozoide en la penetración de la ZP (revisado por Plachot y Mandelbaum, 1990).

Durante la fase de maduración, previo a la ovulación, se inicia también una transformación en las células que rodean al ovocito, desarrollándose complejos de unión focales entre el ovocito y las células foliculares, así como también uniones entre estas últimas; estos complejos de unión se siguen manteniendo, mientras que el área de contacto entre las células va

disminuyendo hasta establecerse finalmente la zona pelúcida. Más tarde con la descarga del pico de LH, las prolongaciones de las células de la corona (capa más interna del cumulus oophorus) se alargan, lo que resulta en la dispersión de las células del cumulus y la zona pelúcida alcanza su madurez (Szöllösi, 1993).

## **2.2.2. Control de la Maduración**

### **2.2.2.1. Factores que inhiben la maduración**

Los ovocitos de mamíferos están bloqueados en el estadio de diplotene (dictiotene) de la primera profase meiótica, interrupción que finaliza una vez que el animal ha alcanzado su madurez sexual y se producen las primeras ovulaciones. En respuesta al pico preovulatorio de LH, el ovocito consigue reemprender la meiosis con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), se consideraba que la competencia para llevar a cabo esta ruptura era adquirida durante el crecimiento folicular, sin embargo se ha observado que la GVBD es independiente del crecimiento del ovocito (Canipari y col, 1984).

Se ha observado que ovocitos plenamente competentes no reinician la meiosis antes del pico preovulatorio de Gonadotropina; ahora bien cuando estos ovocitos con o sin células del cumulus, se cultivan fuera de sus folículos, reinician espontáneamente la meiosis en cualquiera de las especies de mamíferos que han sido estudiados (revisado por Thibault, 1987).

Esta evidencia y el hecho de que las células de la granulosa posean receptores para LH, a diferencia del ovocito, demuestra que el mantenimiento del primer bloqueo meiótico y el posterior reinicio de la meiosis se basan en algún mecanismo originado en las células de la granulosa, en otras palabras las células foliculares son las responsables de esta interrupción de la meiosis (Thibault y col, 1987).

Hasta estos momentos se han descrito por lo menos 3 inhibidores del reinicio de la meiosis: el adenosin monofosfato cíclico (cAMP), el factor inhibidor de la meiosis (Oocyte Meiosis Inhibitor, OMI) y las purinas.

**a) Adenosin monofosfato cíclico (cAMP)**

Se ha observado que niveles elevados de cAMP en los ovocitos previenen la GVBD del ovocito y por tanto el reinicio de la meiosis (revisado por Eppig y Downs, 1984, 1988; Racowsky, 1991; Eppig, 1993).

Por otro lado, tanto en experimentos realizados *In vivo* como *In vitro*, se ha observado una disminución de los niveles citoplasmáticos del cAMP entre la GVBD y la metafase I (revisado por Thibault y col, 1987).

No se conoce exactamente si los niveles de cAMP presentes en el ovocito y que intervienen en el bloqueo meiótico, son sintetizado por el ovocito o por las células foliculares. Estas últimas sintetizarían el cAMP bajo el estímulo de la gonadotropinas y éste pasaría libremente a través de las uniones gap que existen entre las células y el ovocito. Después del pico preovulatorio de LH, a pesar de producirse un incremento en la síntesis de cAMP en las células foliculares, la disminución de esos niveles en el interior del ovocito es posible debido a un incremento en la degradación del cAMP o bien una falta de transferencia, provocada por la rápida disociación de las comunicaciones intercelulares.

**b) Factor inhibidor de la meiosis (Oocytes Meiosis Inhibitor, OMI)**

Tsari y Channing en 1975, observaron que en el fluido folicular del cerdo existía un componente que era capaz de inhibir la meiosis en ovocitos de cerdos y rata. A este factor producido por las células de la granulosa se le denominó OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor).

El efecto inhibitorio del fluido folicular, así como de este factor sobre la meiosis no ha podido ser demostrado por otros investigadores (Sirard y First, 1988). En otros trabajos se ha observado que la inhibición de la meiosis *In vitro* solo ocurría cuando el contacto entre el complejo cumulus-ovocito y las células de la granulosa era más eficaz (Sato y Ishibashi, 1997; Leibfried y First, 1980; Thibault y col, 1987). Años más tarde se ha demostrado que el efecto inhibitorio de las células de la granulosa es dosis dependiente y es amplificada por el líquido folicular o por contacto directo con el ovocito (Sirard y col, 1992).

### **c) Purinas**

Algunas bases y nucleósidos púricos (hipoxantina, adenosina, guanosina, etc.) presentes en el fluido folicular de cerdo y ratón también podrían ser responsables de la inhibición de la meiosis en el folículo (Downs y Eppig, 1985). Apparently estas bases favorecen el mantenimiento de un nivel citoplasmático elevado de cAMP, al inhibir la enzima responsable de su destrucción, la fosfodiesterasa (Eppig, 1993).

#### **2.2.2.2. Control del reinicio y progresión meiótica**

El reinicio de la meiosis se basa en el postulado de dos hipótesis: a) Eliminación de los factores inhibidores y b) Aparición de factores inductores.

##### **a) Eliminación de los factores inhibidores**

El ovocito es capaz de reiniciar la meiosis solo cuando adquiere cierto tamaño dentro del folículo (dominante). Tras la elevación preovulatoria de la hormona luteinizante (pico de LH) y debido a la acción de la hormona Folículo Estimulante (FSH), las células del cumulus secretan ácido hialurónico que provoca la separación física entre el ovocito y las células foliculares. La interrupción de la comunicación entre el ovocito y las células foliculares provoca la eliminación del efecto inhibidor de las células de la granulosa y la disminución del nivel intracitoplasmático de cAMP en el ovocito (revisado por Thibault y col, 1987; Eppig, 1991; Downs, 1993).

Los intentos por demostrar que la interrupción de la comunicación entre las células foliculares y el ovocito suceden antes del reinicio de la meiosis son contradictorios. Diferentes estudios han demostrado que esta interrupción no ocurre hasta después de la ruptura de la vesícula germinal (Moor y col, 1981; Eppig y Downs, 1988). Esta unión permitiría el paso de factores producidos por las células de la granulosa necesarios para la maduración citoplasmática del ovocito (Racowsky, 1991). Otra posibilidad es que sea un cambio cualitativo o cuantitativo en la transferencia del factor inhibitorio el responsable de la eliminación de la inhibición meiótica y no la separación física entre el ovocito y las células foliculares (Moor y col, 1981).

## **b) Aparición de factores inductores**

### **-Factor inductor**

Aunque no se ha confirmado su existencia de forma definitiva, varios estudios suponen la aparición en las células foliculares de un factor inductor del reinicio de la meiosis, que pasaría al ovocito a través de las uniones gap.

Se han mencionado como posibles candidatos: el calcio, algunos productos de la glicólisis como el ATP o el Piruvato, factores de crecimiento, prostaglandinas, insulina y activina A (revisado por Racowsky, 1991).

### **-MPF (Maturation promoting Factor o M-phase Promoting Factor)**

Los trabajos de diferentes autores (Motlik, 1989; Procházka y col, 1989), realizando microyección de citoplasma entre ovocitos, demostraron que los ovocitos en fase de maduración contienen una sustancia no específica de especie capaz de inducir la GVBD y la condensación cromosómica. Esta sustancia es el factor promotor de maduración (MPF, maturing promoting factor ó M-phase promoting factor). Este factor es capaz de inducir el paso de la fase G2 a la fase M de la mitosis o meiosis en numerosas especies, desde anfibios, donde se describió por primera vez, hasta en los mamíferos.

El MPF está compuesto por dos subunidades: Una subunidad reguladora, la ciclina B, y una subunidad catalítica, la p34 (Karp, 1996). El MPF, presente en forma inactiva en los ovocitos inmaduros, se activaría por una serie de reacciones de fosforilación-desfosforilación de sus subunidades, desencadenando dos de los primeros cambios nucleares que ocurren tras el reinicio de la meiosis, como son: la GVBD y la condensación de la cromatina (Hashimoto y Kishimoto, 1988). Para ello se requiere de la síntesis de la ciclina B, su reubicación en el núcleo y la desfosforilación de algunos residuos en la subunidad catalítica (Naito y col, 1995).

La activación del MPF, se produce de forma cíclica. Su actividad aumenta para inducir la metafase I, disminuye después de una proteólisis de la subunidad ciclina, para permitir el paso a anafase I y telofase I, y posteriormente vuelve a activarse antes de la metafase II (Hashimoto y Kishimoto, 1988; Mattioli y col, 1991; Parrish y col, 1992). La formación de la segunda metafase requiere nuevamente de la producción de niveles elevados de MPF-quinasa

activa, esta última es estabilizada por el producto *mos* del proto-oncogen *c-mos* y de esta manera bloquea la progresión del ciclo celular en la Metafase II. La penetración del espermatozoide y el incremento de las concentraciones de calcio intracelular inducen una degradación de las ciclinas que permiten finalizar el ciclo meiótico (Sagata, 1996).

### **-Síntesis proteica**

La síntesis de proteínas específicas, así como también de ARNm, es necesaria en algunas especies de mamíferos para que se produzca el reinicio de la meiosis (cerda: Moltik y Fulka, 1986; oveja: Moor y Crosby, 1986; Moor y Gandolfi, 1987; vaca: Hunter y Moor, 1987), pero no así en el ratón donde la VGBD se produce con inhibición de la síntesis de ARN y proteínas (Crozet y Szöllösi, 1980; Fulka y col, 1986).

## **2.3. Maduración *In vitro***

Los sistemas de maduración *In vitro* (MIV) tienen como finalidad conseguir en el laboratorio que el ovocito continúe con las mismas transformaciones que sufre *In vivo* durante el período de maduración folicular previo a la ovulación, de esta manera se pueden obtener ovocitos viables para la interacción de los gametos, la formación del cigoto y el desarrollo embrionario.

### **2.3.1. Obtención de los ovocitos**

#### **Origen de los ovocitos**

Los ovocitos inmaduros utilizados para la maduración *In vitro* pueden ser obtenidos a partir de:

- a) Ovarios de hembras vivas, mediante la punción de los folículos por vía laparoscópica.
- b) Ovarios de hembras sacrificadas en el matadero.
- c) Ovarios procedentes de hembras ovariectomizadas.

La utilización de ovarios de matadero, procedentes del sacrificio comercial de las hembras, es la fuente de ovocitos mas utilizada para la MIV, FIV y CIV, ya que proporciona un



mayor número de ovocitos si lo comparamos con los otros sistemas, a un precio relativamente bajo. La desventaja de este sistema es la variabilidad tanto del origen como del estado fisiológico de las hembras de diferentes razas, edades, condiciones de llegada al matadero, etc., generalmente imprevisibles y desconocidos.

### **2.3.2. Técnica de recogida de los ovocitos**

Para recoger los ovocitos de los folículos se utilizan principalmente 3 técnicas:

- a) La disección folicular (Lu y col, 1987, 1988) consiste en separar cada folículo y una vez aislado, extrae el ovocito; esta técnica permite mantener la máxima integridad de las células del cumulus que los rodean (Gordon, 1990; Lonergan y col, 1991), así como también, identificar el grado de atresia folicular. Aunque se pueden obtener ovocitos de mayor calidad, es necesario emplear mucho tiempo para recuperarlos, con lo cual, su aplicación es limitada en experiencias donde se requiere un gran número de ovocitos.
- b) La aspiración de los folículos consiste en aspirar el contenido folicular mediante una aguja conectada a una jeringa u otro medio de succión, extrayendo el ovocito del pared folicular, acompañada siempre de pérdida de las células del cumulus (Gordon, 1990). Esta técnica es frecuentemente utilizada en bovinos por la rapidez del procedimiento, además de permitir seleccionar los folículos según su tamaño. Sin embargo, no se recuperan todos los ovocitos de los folículos aspirados, solo un 30 a 60%, o sea, disminuye la cantidad de ovocitos recuperados por ovarios, y solo el 45% de los ovocitos son clasificados como morfológicamente normales (Gordon, 1994).
- c) Las técnicas de recogidas en masa se basan en la obtención del mayor número de ovocitos del tejido ovárico, realizando cortes sucesivos, picando o rallando los ovarios sumergidos en un medio de cultivo. Con esta técnica se recupera un gran número de ovocitos en poco tiempo, pero su calidad es muy variable, ya que proceden de folículos de diversos tamaños y diferentes grados de atresia, por lo que se hace necesario realizar una estricta selección de los ovocitos antes de la MIV (Martino y col, 1994).

### **2.3.3. Factores que afectan la calidad de los ovocitos**

#### **2.3.3.1. Edad de las hembras donantes**

En los diferentes laboratorios de FIV, se han utilizado como donantes de ovocitos, tanto hembras sexualmente maduras (adultas) como también inmaduras o prepúberes.

La utilización de ovocitos procedentes de hembras prepúberes presenta una serie de ventajas al compararse con las hembras adultas, debido a la posibilidad de reducir el intervalo generacional en los programas genéticos (Duby y col, 1996).

Estudios realizados en varias especies sugieren que la calidad y el número de ovocitos obtenidos de hembras prepúberes es inferior a los de hembras adultas, sin embargo la literatura existente aporta resultados contradictorios; así, mientras que algunos autores han observado que los ovocitos procedentes de animales prepúberes tras la MIV, FIV y CIV, se desarrollan en menor grado que los procedentes de animales adultos (bovino: Dahlhausen y col, 1981; Kajihara y col, 1991; Toner y col, 1992; Palma y col, 1993; Revel y col, 1993), para otros investigadores, los ovocitos de hembras prepúberes y los de adulta proporcionan resultados similares de metafase II tras la MIV (caprino: Martino y col, 1995; Mogas, 1994; bovino: Armstrong y col, 1992; Revel y col, 1995). Armstrong y col, en 1992 observaron un mayor porcentaje de división y desarrollo a partir de ovocitos de hembras prepúberes que los procedentes de hembras adultas.

#### **2.3.3.2. Estimulación hormonal de las hembras donantes**

Con la finalidad de incrementar el número de folículos por ovario con un diámetro apropiado para contener un ovocito plenamente competente se han utilizado tratamientos de estimulación ovárica con FSH ó PMSG antes de la recogida de los ovocitos, sin embargo los resultados entre diferentes laboratorios son contradictorios. El uso de tratamientos hormonales de estimulación ovárica presenta como principales inconvenientes, la respuesta variable de las hembras estimuladas y la posibilidad de una activación de los ovocitos antes de la recogida (Kumar y col, 1990).

#### **2.3.4. Selección de los ovocitos**

Para evaluar la calidad del ovocito, diferentes autores han empleado varios criterios siguiendo diferentes esquemas de clasificación. La mayoría se basan en la selección de los ovocitos siguiendo parámetros visuales de valoración morfológica del complejo cumulus ovocito (COCs), el aspecto del citoplasma ovocitario y el tamaño el ovocito. Otros métodos de selección empleados se basan en la morfología del ovario, el diámetro folicular, y también el uso de una tinción vital que evalúe el crecimiento del ovocito, es el caso del test azul de cresol brillante (BCB).

##### **2.3.4.1. Selección según la morfología del ovario**

Para realizar una selección efectiva de ovocitos con mayor competencia para el desarrollo, la morfología del ovario es un parámetro simple y no invasivo (Gandolfi y col, 1997), se dividieron los ovarios en tres categorías basándose en:

- a) La presencia de un folículo >10mm de diámetro.
- b) La presencia de más de 10 folículos de 2-5mm de diámetro y ninguno de los folículos de >10mm.
- c) La presencia de <10 folículos de 2-5mm de diámetro y ningún folículo >10mm.

##### **2.3.4.2. Diámetro y/o aspecto de los folículos ováricos**

El diámetro folicular juega un papel muy importante en la selección de los ovocitos, ya que varios estudios describen que la competencia de los ovocitos para el desarrollo puede estar influenciada por el tamaño del folículo del que procedan (Tan y Lu, 1990; Pavlok y col, 1992; Lonergan y col, 1994; Blondin y col, 1995; Yang y col, 1998) y por su calidad (Hazelger y col, 1995; Carolan y col, 1996; Mermillod y col, 1999).

La adquisición de la competencia meiótica y para el desarrollo ocurre de manera progresiva en los ovocitos con el aumento del tamaño de los folículos y está correlacionada con la transcripción de la síntesis de ARN nucleolar (Moor y col, 1987; Fair y col, 1995; Briggs y col, 1999).

Estudios realizados en diferentes especies han indicado que los ovocitos que proceden de folículos de pequeño diámetro son incapaces de reanudar la meiosis o ésta se bloquea en el estadio de metafase I (Moor y Trounson, 1997; De Smedt y col, 1994; Fair y col, 1995). Barnes y col., 1991, describieron que los ovocitos bovinos procedente de folículos de diámetro pequeño, a pesar de ser capaces de realizar la maduración nuclear, eran citoplasmáticamente inmaduros. Asimismo, Arlotto y col, (1996) observaron que ovocitos bovinos de tamaño grande procedentes de folículos grandes tenían mayor capacidad para el desarrollo que los que procedían de folículos más pequeños, a pesar de tener el mismo potencial de maduración. Estos hallazgos, que describen la relación entre la competencia para el desarrollo ovocitario y el tamaño folicular señalan indirectamente una conexión entre el crecimiento del ovocito y la competencia para el desarrollo.

En caprinos, se ha descrito una relación entre el tamaño del folículo y la adquisición de la competencia meiótica. De Smedt y col, (1994) describieron que la adquisición de la competencia meiótica ocurre progresivamente durante el crecimiento folicular. Así, observaron que ovocitos recuperados a partir de folículos de 0.5-0.8mm de diámetro eran capaces de reanudar la meiosis (con VGBD), los ovocitos provenientes de folículos de 1.0-1.8mm podían alcanzar la metafase I, y los ovocitos procedentes de folículos mayores de 2mm eran capaces de progresar a metafase II.

Así, Crozet y col, (1995) han obtenido porcentajes de metafase II del 70%, 83% y 97% en los ovocitos procedentes de folículos pequeños (2-3mm), medios (3.1-5mm) y grandes (>5mm) respectivamente.

En cabras prepúberes se han observado que la mayoría de los ovocitos alcanzan la competencia meiótica en los folículos con diámetro  $\geq 3$ mm (Martino y col, 1994). Así, con ovocitos procedentes de folículos medianos (2-2.9mm de diámetro) un 56.6% de metafase II, y con los de folículos grandes (3-6mm de diámetro) un 74.8% de metafase II.

La apariencia macroscópica del folículo, también es un aspecto a tener en cuenta para seleccionar ovocitos más viables. Se ha descrito que los ovocitos procedentes de folículos translúcidos debido a una avanzada atresia, tienen reducida su viabilidad (Greve y Madison, 1991).

#### **2.3.4.3. Diámetro del ovocito**

La relación entre competencia de desarrollo del ovocito y el tamaño folicular, indirectamente indica la existencia de una relación entre el crecimiento del ovocito y su capacidad de desarrollo (Otoi y col, 1997; Mermillod y col, 1999). El crecimiento del ovocito lo capacita progresivamente para reanudar la meiosis, y la competencia meiótica aparece cuando el ovocito presenta un 80-90% de su tamaño máximo. Sin embargo hasta que no alcanza su tamaño máximo no es capaz de llegar a la metafase II y completar la maduración (Thibault y col, 1987).

Los ovocitos bovinos adquieren la competencia meiótica completa al alcanzar 115µm de diámetro, pero no alcanzan la competencia total para el desarrollo hasta blastocistos con este diámetro, si no cuando posean 120µm (Otoi y col, 1997).

En la especie ovina, se ha indicado que los ovocitos adquieren la capacidad para continuar hasta metafase I cuando alcanzan el 80% de su tamaño total, pero son incapaces de progresar hasta metafase II sino se ha completado el crecimiento. En ovocitos de ovejas prepúberes, la adquisición de la competencia meiótica, estaría estrechamente relacionada con el diámetro del ovocito, ya que con ovocitos de 142µm de diámetro procedentes de ovarios de prepúberes y de adultas se han obtenido similares tasas de maduración (79.8 vs 70.6%) (Ledda y col, 1997, 1999).

En ovocitos porcinos, también se ha demostrado la relación entre el diámetro del ovocito y la competencia meiótica (Motlik, 1989).

#### **2.3.5. Factores que afectan la maduración**

En la actualidad, todos los investigadores reconocen que las condiciones de cultivo utilizadas para la maduración *In vitro* tiene una gran influencia sobre la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

##### **2.3.5.1. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados para la maduración *In vitro* de los ovocitos son muy diversos y comprenden desde el empleo de soluciones fisiológicas simples como el Brinster's

BMOC-3 y el Krebb's Ringer Tampon modificado, hasta medios más complejos como el TCM-199, el Ham's F10 y el MEM, entre otros. Siendo el TCM-199 (medio de cultivo tisular) actualmente el medio más ampliamente utilizado en los sistemas de MIV y FIV (Greve y Madison, 1991; Bavister y col, 1992; Brackett y Zuelke, 1993). Este medio está formado por sales de Earle suplementadas con Piruvato, lactato, aminoácidos, vitaminas, purinas, otras sustancias consideradas esenciales para los cultivos celulares en general. También pueden contener los tampones HEPES y bicarbonato de sodio.

### **2.3.5.2. Condiciones de cultivo**

#### **a) pH y Osmolaridad**

Independientemente del medio utilizado, el pH óptimo para la maduración debe oscilar entre 7.2 y 7.4 (Staigmiller, 1988). El medio de MIV debe ser isotónico con los fluidos naturales de los tejidos. La osmolaridad debe oscilar entre 285 y 329mOsm/Kg, considerando el rango óptimo que permite obtener porcentajes de maduración convenientes (Staigmiller, 1988; Gordon, 1994).

#### **b) Condiciones de Incubadora**

##### **-Atmosfera**

La composición de la atmosfera gaseosa para una maduración óptima, está muy relacionada con la composición del medio de cultivo empleado. Así, los medios tamponados con bicarbonato necesitan un cierto nivel de CO<sub>2</sub> para el normal funcionamiento de las células y mantener constante el pH del medio. Mientras que los medios en los que se ha empleado como tampón HEPES o fosfatos, no necesitan una fase gaseosa controlada de CO<sub>2</sub> para mantener relativamente constante el pH. Las condiciones atmosféricas óptimas para la MIV y FIV de ovocitos bovinos son un 5% de CO<sub>2</sub> en aire (Pinyopummintr y Bavister, 1995).

##### **-Temperatura**

El cultivo de los ovocitos se realiza normalmente a la temperatura corporal fisiológica de la especie en estudio, de la cual proceden los ovocitos. En el caprino es de 38 – 39°C (revisado por Gordon, 1994).

### **c) Tiempo de cultivo durante la maduración**

El tiempo para completar la maduración *In vitro* es ligeramente diferente entre especies. El tiempo de maduración necesario por los ovocitos de vaca y oveja oscila entre las 24 y las 26 horas (revisado por Staigmiller, 1988; Greve y Madison, 1991).

Contrariamente los ovocitos de cerda requieren aproximadamente 48 horas para completar la metafase II (McGaughey y Polge, 1971) y el de cabra 27 horas (D'Smedt y col, 1992; Kenkistepe y col, 1994; Martino y col, 1994; Crozet y col, 1995). Así mismo se puede concluir que ovocitos de dromedarios requieren de 32 - 44 horas de Cultivo de *In vitro* para obtener un número óptimo de ovocitos en estadio de Metafase II (Wani y col, 2005; Abdoon, 2001). Estudios en llamas demuestran una baja tasa de maduración (ovocitos en Metafase II), 30.4% después de 30 horas de cultivo (Del Campo *et al*, 1994).

### **d) Sistemas de cultivo**

Para la maduración *In vitro* de ovocitos se suelen utilizar dos sistemas de cultivo:

- a) Microgotas de medio cubiertas con aceite mineral.
- b) Mililitros de medio en una placa de petri, generalmente con células de la granulosa.

### **2.3.5.3. Papel de las células del cumulus durante la MIV**

La presencia de las células del cumulus, es quizás el factor principal entre los existentes, para completar satisfactoriamente la maduración del ovocito (Trounson, 1992). Las células del cumulus parecen no ser necesarias para la maduración nuclear del ovocito (Chian y col, 1994). No obstante, su presencia acelera el proceso de maduración, promoviendo la maduración normal del citoplasma, demostrado por la reducción de las fecundaciones anormales (Vanderhyden y Armstrong, 1989). La importancia de estas células se basan en la impermeabilidad de la membrana del ovocito a varios metabolitos de bajo peso molecular, tal es el caso de la colina, uridin, inositol, etc. El paso de estas sustancias se cree ocurre exclusivamente por medio de los procesos celulares y las uniones gap de las células del cumulus (Gordon, 1994). Durante la maduración existe una cooperación metabólica entre el ovocito y las

células del cumulus. De hecho estas células permanecen en contacto, vía las uniones gap, durante todo el periodo de maduración (Sutovsky y col, 1993). Además, estas células generan señales que controlan y regulan el metabolismo del ovocito, así como también muchos aspectos de su maduración (revisado por Greve y Madison, 1991). Así las células de la granulosa y/o del cumulus pueden actuar directamente sobre el ovocito mediante sus uniones gap o a través de receptores para sus productos de secreción (Thibault y col, 1987).

## **2.4. Fecundación de los Ovocitos**

### **2.4.1. Transporte de espermatozoides y fecundación**

Durante la cópula el macho maniobra el pene alrededor de la vulva hasta ubicar la vagina, atraviesa la cerviz y llega hasta uno de los cuernos uterinos, para después realizar cambios sucesivos de un cuerno a otro a lo largo de la eyaculación (Franco y col, 1981). El movimiento del pene en el interior del útero provoca una inflamación del endometrio, con edema e hiperemia (Bravo y col, 1996a; Velásquez y col, 1999). La cópula tiene una duración promedio de 20 á 30 minutos, con un rango muy amplio entre 5 á 65 minutos (England y col, 1971; Sumar, 1985; Fernández Baca, 1993). La duración de la cópula está influida por diversos factores: número de machos presentes de manera simultánea, edad de las hembras, jerarquía dentro del rebaño, hora del día, estación del año, etc. (Escobar, 1984; Knight y col, 1992; Pollard y col, 1999; Vaughan, 2001). No existe un criterio único que determine el tiempo de duración de la cópula sobre el desencadenamiento de la ovulación, reportándose desde un mínimo de 5 minutos (Pollard y col, 1991) hasta los 12 minutos (Parraguez y col, 1997).

En los camélidos, durante la cópula se producen contracciones uterinas y en el macho, las contracciones uretrales están uniformemente distribuidas y la eyaculación es un proceso continuo (Bravo P, 2002), depositando el semen en la luz uterina. El semen de los camélidos es altamente viscoso (San Martin y col, 1968) y la motilidad espermática es de tipo oscilatoria sugiriendo que los espermatozoides de los camélidos requerirían un proceso previo de capacitación antes de que ocurra la fecundación (Sumar, 1996, Bravo y col, 1996) más aun cuando se conoce que la ovulación ocurre alrededor de las 30 después de la copula (Huanca y col, 2001).



Aún cuando el semen es altamente viscoso por lo que requiere un proceso previo de licuefacción del semen (Garnica y col, 1993) y ayudado por las contracciones ciliares del oviducto, se ha determinado la presencia de un 76% de espermatozoides en la unión útero - tubárica a las 6 horas post cópula y más del 90% a las 12 horas, con un porcentaje máximo de espermatozoides en el Istmo a las 18 horas. Posteriormente se produce un proceso retrogrado de los espermatozoides desde el istmo a la unión útero - tubárica, actuando como el principal reservorio de los espermatozoides (Bravo y col, 1996). No se han determinado diferencias entre el número de espermatozoides distribuidos en el cuerno izquierdo o derecho, resultado del proceso de reposicionamiento del pene durante la cópula (Bravo y col, 1996; Garnica y col, 1993).

Aún cuando no hay estudios específicos, se considera que los ovocitos de alpacas procedentes de folículos preovulatorios  $\geq 7\text{mm}$ , tienen capacidad de reiniciar la maduración nuclear y están aptos para la fecundación. Los espermatozoides, para interactuar con la zona pelúcida tienen que atravesar el complejo de las células del cumulus, para lo cual deben actuar sobre la matriz de ácido hialurónico que rodea las células y que las mantiene unidas. La liberación de la hialuronidasa, enzima que se encuentra almacenada en el acrosoma, permite la separación del cúmulo facilitando el paso de los espermatozoides y unirse a la Zona Pelúcida. Similar a lo reportado en otros mamíferos, se ha determinado una zona pelúcida (ZP) rodeando el ovocito, constituida por tres proteínas ZP1a (110 kDa), ZP2a (75kDa) y ZP3a (65kDa), siendo esta última la que presenta homología estructural a las ZP3 de otras especies (Guzmán, 2009).

La tasa de fecundación en camélidos es superior al 80% (Fernández - Baca y col, 1970) pero ocurre una tasa del 25 al 50% de muerte embrionaria temprana sin haberse determinado las causas (Fernández - Baca y col, 1970; Sumar, 2007). Una vez ocurrida la interacción del espermatozoide y óvulo se inicia el proceso de división y desarrollo embrionario, habiéndose reportado que a los 4 días post copula es posible encontrar embriones en estadios iniciales de 4 á 8 células (Bravo y col, 1996) y que los embriones ingresan al cuerno uterino entre el día 5 á 6 (Del Campo y col, 1995). En yeguas se ha reportado la presencia de una válvula dividiendo el útero del oviducto (Bettridge y Mitchel, 1971), actuando como una barrera física que impide el paso de embriones muertos. Similar válvula ha sido reportada en alpacas y que posiblemente actúe como una barrera física sobre los espermatozoides con motilidad deficiente y para impedir el paso de embriones muertos (Bravo y col, 1996).

La fecundación es un proceso complejo de interacción celular que tiene como resultado la unión de los gametos femenino y masculino, la restauración del número cromosómico somático de las especies y el inicio del desarrollo de un nuevo ser. Para que la fecundación sea correcta es necesario que previamente el ovocito haya madurado y el espermatozoide esté capacitado.

## **2.4.2. Bases Fisiológicas**

### **2.4.2.1. Capacitación del espermatozoide**

Austin y Chang en 1951, trabajando independientemente, observaron que los espermatozoides de mamíferos procedentes del eyaculado deben permanecer cierto tiempo en el tracto genital femenino para poder fecundar el ovocito (Bazer y col, 1993).

En 1992, Austin propuso el término capacitación para definir los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el espermatozoide durante este tiempo y que le permita adquirir la capacidad fecundante (revisado por Yanagimachi, 1994).

La capacitación espermática prepara el espermatozoide para adherirse y penetrar el ovocito (Bazer y col, 1993) el cual implica una serie de cambios intracelulares y alteraciones bioquímicas de la membrana plasmática del espermatozoide, principalmente a nivel de la cabeza.

El aspecto fundamental de la capacitación espermática es la remoción de la cobertura de proteínas depositadas sobre el espermatozoide durante su recorrido por el tracto genital masculino (revisado por Hernández, 2001). Se ha descrito la eliminación gradual y/o alteración de las glucoproteínas periféricas, la reordenación de las glucoproteínas integrales, la reducción en el colesterol de membrana y los cambios en la distribución y composición de ciertos fosfolípidos de membrana (Yanagimachi, 1981; Fournier-Delpech y Thibault, 1991; citado por Izquierdo, 1996).

Los primeros eventos de la capacitación consisten en un reordenamiento bioquímico de la membrana plasmática del espermatozoide que conduce a un incremento en la permeabilidad

al calcio, lo que resulta en un aumento de las concentraciones intracelulares de este ion y de cAMP (Hunter, 1987).

*In vivo* la capacitación espermática no se produce en un sitio específico del tracto genital femenino, llevándose a cabo quizás en todas sus partes (Yanagimachi, 1994). Es un proceso espontáneo que puede ocurrir en una gran variedad de medios artificiales sin presencia de ninguna hembra; lo cual podría indicar que el tracto genital femenino más que inductor de la capacitación, regularía el proceso a través de los distintos fluidos secretados por las diferentes porciones del tracto (revisado por Yanagimachi, 1994).

Durante la capacitación los espermatozoides de prácticamente todos los mamíferos sufren un cambio en su movimiento flagelar. De esta manera, previo a la reacción acrosómica o al mismo tiempo que ésta, se producen cambios drásticos en el patrón de movimiento del espermatozoide, el cual pasa de una movilidad progresiva y lineal a un patrón de movimiento flagelar asimétrico y vigoroso con cambios frecuentes de dirección, y casi circular (revisado por Yanagimachi, 1994). Este nuevo movimiento recibe el nombre de hiperactivación espermática, la cual incrementa la probabilidad de los espermatozoides de entrar en contacto con el ovocito, así como también atravesar las cubiertas ovocitarias (Bazer y col, 1993).

#### **2.4.2.2. Penetración de las envolturas ovocitarias y reacción acrosómica de los espermatozoides.**

En la mayoría de los mamíferos, en el momento de la fecundación, el cumulus está todavía asociado al ovocito (Yanagimachi, 1988), mientras que en los rumiantes éste se pierde rápidamente justo después de la ovulación (Crozet, 1984; Crozet y Dumont, 1984; Crozet y col., 1987; Hyttel y col., 1988b).

Se ha observado que los espermatozoides son capaces de atravesar las células del cumulus sin haber sufrido reacción acrosómica (Cherr y col., 1986). Es más, se ha observado también que esta envoltura es atravesada por los espermatozoides capacitados que mantienen intacto su acrosoma (Crozet, 1991). Por lo que el mecanismo más importante para la penetración del cumulus parece ser la fuerza mecánica del espermatozoide y no la hialuronidasa liberada durante la reacción acrosómica. Sin embargo la existencia de hialuronidasa asociada a la membrana plasmática parece facilitar el paso de los espermatozoides a través de la matriz de

ácido hialurónico en aquellas especies que la presentan (Yanagimachi, 1988). Se ha comprobado que la penetración del cumulus no es especie específica (Yanagimachi, 1994).

Al llegar los espermatozoides a la zona pelúcida, estos se adhieren a ella y sufren la reacción acrosómica, esta consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa (Hyttel y col., 1988b). La formación de vesículas permite la salida de las enzimas existentes en el acrosoma y la exposición y contacto de la membrana acrosómica interna con la zona pelúcida. Este evento es indispensable para que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida y entrar en contacto con la membrana plasmática del ovocito (Crozet, 1991). Todo este proceso es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , cuya concentración aumenta intracelularmente debido a los cambios sufridos en la membrana durante la capacitación (Kurpisz, 1993). Los espermatozoides una vez capacitados se unen firmemente a las zonas pelúcidas antes de penetrarla mediante la interacción de proteínas altamente específicas y afines. La zona pelúcida es una envoltura del ovocito formada esencialmente por glucoproteínas. La zona pelúcida contiene tres glucoproteínas: llamadas Zona Proteica (ZP) 1, 2, 3 (ZP1, ZP2, ZP3) (Wassarmann, 1988b, 1990). La ZP1 es una proteína estructural, la ZP2 es un receptor secundario del espermatozoide una vez que éste ha reaccionado, la ZP3 actúa como un receptor de espermatozoides uniéndose a las proteínas presentes en la membrana espermática.

Después de efectuar su reacción acrosómica, el espermatozoide se desprende de las vesículas acrosómicas en la superficie de la zona pelúcida y penetra a través de ella siguiendo una trayectoria oblicua, lo que le permitirá conservar intacto el segmento ecuatorial para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Esto sucede debido a la combinación de la acción mecánica, producida por el movimiento hiperactivo de la cola y la acción de las enzimas acrosómicas, que digieren componentes estructurales de la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988).

#### **2.4.2.3. Fusión de los gametos**

Tras penetrar la zona pelúcida, la cabeza del espermatozoide cruza el espacio perivitelino y entra en contacto con la membrana plasmática del ovocito. La interacción de las membranas plasmáticas del ovocito y del espermatozoide implica al menos dos pasos distintos: la unión y la fusión (McLeskey y col., 1998).

La unión, conlleva un contacto molecular de las dos membranas. Puede ocurrir en cualquier punto de la superficie de la membrana plasmática del ovocito y puede involucrar cualquier región de la membrana espermática incluyendo la membrana acrosómica interna, ello sugiere que esta unión puede estar mediada por interacciones celulares no específicas (Yanagimachi, 1994).

La fusión, el segundo paso, tiene requerimientos más estrictos si se le compara con la unión. Requiere que se produzca la reacción acrosómica, ya que ésta, no solo permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida sino que también provoca cambios ultraestructurales profundos en la membrana que incluyen la aparición y la migración de proteínas (Yanagimachi, 1994). La fusión solo ocurre en dominios celulares específicos, así como también temperatura, pH y condiciones iónicas precisas (revisado por McLeskey y col., 1998). La fusión rara vez ocurre en el área sobre la placa metafásica (Shalgi y Phillips, 1980; Phillips y Shalgi, 1982; Talansky y col., 1991). La región responsable del inicio de la fusión es aun controversial, sin embargo el segmento ecuatorial del espermatozoide parece ser esencial para la fusión con la membrana plasmática del ovocito (McLeskey y col., 1998). Posteriormente de ésta, la región acrosómica es transportada hacia el interior del citoplasma en una vesícula formada por la membrana acrosómica interna del espermatozoide y la membrana plasmática del ovocito (Hyttel y col., 1989b). A medida que este proceso transcurre comienza la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino.

Durante la Fecundación *In vitro*, se produce una mayor proporción de ovocitos poliespermicos que en la Fecundación *In vivo* (Xu y Greve, 1988; Hyttel, 1989a). La poliespermia se relaciona con anomalías en la liberación y dispersión del contenido de los gránulos corticales. La causa de la poliespermia en los ovocitos podría tratarse de la no dispersión del contenido de los gránulos, por un retraso en la migración periférica de los gránulos corticales durante la Maduración *In vitro*, mientras que la falta de dispersión del contenido es debido al ambiente que existe durante la Fecundación *In vitro* (revisado por Hyttel y col, 1989a).

#### **2.4.2.4. Reanudación de la meiosis**

En la mayoría de los mamíferos vertebrados los ovocitos son fecundados en el estadio de metafase de la segunda división meiótica. Durante la activación del ovocito, éste reemprende

la meiosis continuando con la anafase II, la telofase II, dividiéndose asimétricamente en dos células de tamaño distinto: el ovocito fecundado y el segundo corpúsculo polar.

#### **2.4.3. Factores que influyen sobre la eficiencia de la FIV**

La eficiencia de la fecundación *In vitro*, depende de una correcta maduración del ovocito y la capacitación del espermatozoide. Son varios los factores que pueden tener efecto sobre los resultados de la fecundación. Así, durante la FIV se han de tener en cuenta la procedencia de los ovocitos, la concentración de los espermatozoides, el tiempo de interacción de los gametos, el medio utilizado, las condiciones de cultivo, y también la suplementación del medio. Estos factores pueden interferir significativamente en el éxito de la FIV y por tanto en el subsiguiente desarrollo embrionario.

##### **2.4.3.1. Procedencia de los ovocitos**

En la FIV se pueden utilizar ovocitos ovulados (madurados *In vivo*) o provenir de un tratamiento de maduración *In vitro*. Diversos autores han descrito una menor capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos madurados *In vitro* con respecto a los madurados *In vivo* (Leibfried-Rutledge y col., 1987; Laurincik y col., 1994). Pero otros no (Crozet y col., 1987a).

##### **2.4.3.2. Preparación de los espermatozoides para la FIV**

En la metodología de preparación de los espermatozoides para la FIV, se debe tener en cuenta la efectividad del sistema de capacitación utilizado, de modo que se pueda controlar la poliespermia y garantizar que los espermatozoides puedan fecundar los ovocitos.

Un factor importante a tomar en cuenta es el origen del semen, si se trata de semen fresco o congelado. Se ha demostrado que los espermatozoides procedentes de semen fresco requieren de un periodo de incubación más largo para su capacitación que los procedentes de semen congelado (Wheeler y Seidel, 1986). El uso de semen fresco también produce mejores tasas de penetración (Seaton y col. 1991), el problema que presenta es que su calidad es menos predecible, debido a las posibles diferencias de los eyaculados. También se ha observado que los espermatozoides de distintos machos difieren no solo en la capacidad de fecundar ovocitos *In vitro* (Hanada, 1985; Fukui y col. 1988), si no también tienen su influencia sobre el desarrollo embrionario (Fukui y col., 1988). Estas diferencias podrían deberse a variaciones en la edad de

los machos (Sirard y Lambert, 1985) a las condiciones ambientales y de manejo, a la composición del plasma seminal, relación entre el volumen y número de espermatozoides del eyaculado (Fukui y col. 1988).

La colección de semen en camélidos machos es dificultosa y aún no se han determinado técnicas para la obtención de semen congelado viable, para esto las técnicas de FIV serían algo imposibles. Sin embargo, se demuestra la obtención directa de espermatozoides a partir del epidídimo. Estos epidídimos pueden ser colectados de centros de beneficio para ser usados en la FIV (Del Campo *et al*, 1994).

#### **2.4.3.3. Técnica de lavado y de separación de los espermatozoides del plasma seminal**

Después de obtener el semen, procedente del eyaculado para el caso de semen fresco o bien si es congelado, el siguiente paso consiste en lavar los espermatozoides, en el primer caso para eliminar el plasma seminal, puesto que éste contiene sustancias que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide e impiden su capacitación y posterior reacción acrosómica (First y Parrish, 1987) y en segundo caso, para eliminar los crioprotectores y/o conservantes utilizados.

Para lavar el semen y concentrar la fracción de espermatozoides móviles, han sido propuestas numerosas técnicas, el método del “swim-up” (nadar hacia arriba) (Berger y col., 1985; Parrish y col., 1986), también otros métodos como: la centrifugación en gradiente de densidad de BSA (White y col., 1984) o Percoll (Utsumi y col., 1991; Seidel y col., 1995), o la separación mediante columnas de lana de vidrio o de sephadex (Stubblings y Wosik, 1991).

#### **2.4.3.4. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica *in vitro***

Desde que Chang (1951) y Austin (1951) señalaron la necesidad de que los espermatozoides fueran capacitados para adquirir el poder de fecundar ovocitos (Bazer y col., 1993), se han empleado diferentes métodos para inducir la capacitación espermática *In vitro*.

Los mecanismos que acontecen durante la capacitación de los espermatozoides de mamíferos no son totalmente conocidos, en la actualidad los procedimientos de capacitación artificial están dirigidos a estimular la secuencia de eventos que normalmente transcurren en el tracto reproductivo de una hembra.

Se han descrito varios métodos, entre éstos: la incubación en soluciones hipertónicas (HIS-High Ionic Strength, 380 mOsm; Brackett y col., 1982), el tratamiento con fluido folicular (Fukui y col., 1983) o fluido oviductal (Parrish y col., 1989), el uso de calcio ionóforo A23187 (Shorgan, 1984 revisado por Mogas, 1994), el co-cultivo con células oviductales (Guyader y Chupin, 1991), entre otros, pero el método más utilizado es la incubación con heparina (glicosaminoglicanos) (Parrish y col., 1986).

Los glucosaminoglicanos (GAGs) han sido identificados como eficientes inductores de la capacitación espermática *In vitro*. Este grupo de carbohidratos (polisacáridos) conformado por unidades repetitivas de disacáridos incluyen a la heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, keratan sulfato y el ácido hialurónico. Los GAGs están presentes a nivel del fluido folicular y son vertidos a oviducto en el momento de la ovulación. Además, están presentes a lo largo del tracto reproductivo de la hembra (revisado por Hernández, 2001). De ellos, la heparina ha sido el más potente inductor de capacitación y su uso está muy generalizado en los laboratorios de FIV. También se ha descrito una mayor repetibilidad y mejor adaptación a las diferencias entre machos (First y Parrish, 1988).

#### **2.4.3.5. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática en la gota de FIV**

Tras lavar y seleccionar los espermatozoides mas móviles por medio de alguna de las técnicas descritas anteriormente, en muchos laboratorios de FIV se utiliza algún agente químico que permita estimular y mantener esa motilidad.

La cafeína y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) han sido los más empleados (revisado por Gordon, 1994). En el caprino, para el tratamiento de espermatozoides de semen fresco, el uso de sustancias como la cafeína y la mezcla de PHE no mejoran los resultados de penetración y desarrollo embrionario al compararlo con la utilización de heparina e hipotaurina (Izquierdo y col., 1998).

#### **2.4.3.6. Concentración espermática en el medio de FIV y tiempo de co-cultivo de los gametos**

En condiciones *In vitro* la incidencia de poliespermia es superior que en condiciones *In vivo*. *In vivo*, solo unos pocos espermatozoides están presente cerca de los ovocitos durante la fecundación (Cummins y Yanagimachi, 1982) mientras que *In vitro*, la concentración



espermática varía normalmente entre  $10^4$  y  $10^6$  espermatozoides/ml. Por esto en condiciones *In vitro*, puede ocurrir la penetración espermática múltiple antes del establecimiento completo del bloqueo de la poliespermia. Desafortunadamente, son pocas las condiciones de cultivo que pueden mantener la movilidad espermática a concentraciones comparables a las de *In vivo*. Así, no solo la concentración espermática si no también el tiempo de interacción espermatozoide-ovocito ha de ser controlado para reducir la incidencia de poliespermia (First y Parrish, 1987).

Por otro lado, los ovocitos incubados con una concentración alta de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación están expuestos a la acción de enzimas hidrolíticas liberadas por los espermatozoides muertos, lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial de desarrollo. Así, la duración del co-cultivo de los gametos no debería sobrepasar el tiempo necesario para que se produzca la máxima penetración (revisado por Gordon, 1994).

En relación a la duración de co-cultivo, este varía entre los protocolos de los distintos laboratorios de FIV (17 horas: De Smedt y col., 1992; Cognie y col., 1995; Crozet y col., 1995; 18 horas: Cox y col., 1994; 20 horas: Pawshe y col., 1994; 24 horas: Younis y col., 1991; Kenkistepe y col., 1994; Mogas, 1994).

#### **2.4.3.7. Presencia de células en el medio de FIV**

La presencia de las células del cumulus y su papel durante la fecundación es controversial. En algunos estudios donde los ovocitos madurados *In vitro* son desnudados la fecundación mejora (Lu y col. 1987; Fuki y col. 1988) mientras que otros autores indican que dichas células son importantes para maximizar la penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida, ayudando en la reacción acrosómica (Fukui, 1990; Saeki y col. 1994). En caprinos, varios autores también han observado que la presencia de estas células, bien rodeando al ovocito o formando una monocapa, proporciona mejores resultados de fecundación (Kenkistepe y col. 1996).

En los medios de capacitación y fecundación se han utilizado también otras líneas celulares somática, específicamente células del epitelio oviductal (CEO) bovino: Pollard y col., 1991; Miller y col., 1994; porcino: Nagai y Moor, 1990).

Se ha especulado que tanto las células de la granulosa como las CEO podrían secretar algún factor que mantendría la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (revisado por Gordon, 1994). El efecto beneficioso de los co-cultivo podría deberse a la producción de factores embriotróficos por parte de las células somáticas, así como también a su acción detoxificante de los productos nocivos existentes en el medio de cultivo (Bongso y Fong, 1991).

## **2.5. Desarrollo Embrionario**

### **2.5.1 Primeros estadios del desarrollo embrionario**

El periodo embrionario se inicia con la fecundación. El desarrollo de los embriones, hasta su implantación en el útero, se caracteriza por una sucesión de divisiones celulares hasta la formación del blastocisto y la eclosión de la zona pelúcida.

### **2.5.2 División embrionaria y formación del blastocisto**

En los mamíferos, la primera división mitótica (el inicio del estadio de 2 células) separa al cigoto en 2 células denominadas blastómeros, de aproximadamente el mismo tamaño y que tiene lugar entre las 11 y las 20 horas post-inseminación irrespectivamente de la especie. La segunda división (inicio del estadio de 4 células) es algo asincrónico, lo que resulta en la existencia de un estadio de 3 células por un corto periodo de una o dos horas aproximadamente. La duración de este estadio difiere según la especie estudiada. A partir de la tercera división (inicio del estadio de 8 células), las divisiones celulares son iguales, cortas, con breves fases G y dominadas por las fases S y M, es decir, que cada mitosis está seguida inmediatamente por la síntesis de ADN en las dos células hijas, sin poderse detectar fases de pausa (Barnes y Eyestone, 1990). En estas primeras etapas, las blastómeras formadas son esféricas, están unidas mediante puentes citoplasmáticos y a medida que transcurre la división son cada vez más pequeñas, ya que no se produce un incremento en el volumen total del embrión (Anderson, 1991).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de estudio**

El estudio, según las actividades desarrolladas, fue realizado en tres diferentes lugares:

a) Obtención de las muestras de ovarios: Las muestras de ovarios fueron obtenidos del camal municipal del Distrito de Nuñoa, ubicado en la Provincia de Melgar, Departamento de Puno; localizado a 4023 m.s.n.m., con una latitud 14°28'36'' y longitud 70°38'14'' (INEI, 2008), durante los meses de enero – marzo del 2009 (época de lluvia); b) Procesamiento y desarrollo de las actividades relacionadas con la maduración y fecundación de ovocitos: El procesamiento de los ovarios para obtener ovocitos, fecundación y fijación de muestras se efectuaron en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; c) Lectura de las muestras fijadas de ovocitos: La tinción, lectura y evaluación de las muestras fijadas de ovocitos, se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela – España.

#### **3.2. Equipos y materiales**

Los equipos utilizados en el presente estudio fueron los siguientes:

- |                                 |                           |
|---------------------------------|---------------------------|
| - Incubadora de CO <sub>2</sub> | - Cámara de flujo laminar |
| - Estéreo microscopio           | - Microscopio             |
| - Potenciómetro                 | - Balanza analítica       |
| - Platina térmica               | - Baño maría              |

- Homogenizador magnético      - Vórtex
- Refrigerador – Congelador      - Autoclave
- Material de laboratorio diverso: Placas Petri, tubos falcón, pipetas, etc.

### **3.3. Composición y preparación de los medios**

Para la preparación de los medios se utilizaron componentes adquiridos del Laboratorio Química Service S.A. (marca SIGMA). Se utilizó agua ultra pura (Sigma-W3500) para la preparación de los medios. Los medios fueron ajustados a un pH a 7.4 y posteriormente esterilizados a través de un filtro de membrana con diámetro de 0.22µm. Los procedimientos fueron realizados bajo una cámara de flujo laminar. Los medios preparados fueron colocados en frascos Falcón y almacenados en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso, por un periodo no mayor a las 2 semanas.

#### **3.3.1. Medio de Transporte**

El transporte de ovarios desde el camal de Nuñoa (Puno) hasta el laboratorio de Reproducción Animal de la FMV (Lima), se realizó en una solución salina al 0.9% (NaCl) suplementado con antibiótico – antimicótico (Sigma-A5955), conteniendo 10000UI/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomycin y 25µg/ml anfotericina B, y mantenido en un termo, a temperatura inicial de 35°C.

#### **3.3.2. Medio de Lavado Pre-maduración**

Para el lavado de ovocitos se empleó como medio base el TL-HEPES (Sigma-H4034) (Apéndice 1); suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (v/v), 100mM Piruvato (Sigma-P5280), 5mg/ml Gentamicina (Sigma-G1264).

#### **3.3.3. Medio de Maduración (TCM-199) Apéndice 3.**

Para la Maduración *In vitro* se utilizó como medio base M-199 (Sigma-M2520) (Apéndice 2), suplementado con 10% SFB (v/v), 100mM Piruvato, 5mg/ml Gentamicina, 0.5µg/µl FSH, 1µg/µl hCG y 1mg/ml 17β-Estradiol (Sigma-E2758).

#### **3.3.4. Medio de Lavado Pre-fecundación**

Para el lavado de ovocitos madurados se empleó como medio base el TL-HEPES; suplementado con 3mg/ml Suero Albúmina Bovina (BSA), 100mM Piruvato y 5mg/ml Gentamicina.

#### **3.3.5. Medio de Fecundación**

Para la Fecundación se utilizó como medio base el TL-STOCK (Apéndice 4) suplementado con 6mg/ml BSA, 100mM Piruvato y 5mg/ml Gentamicina.

#### **3.3.6. Medio de Lavado Pre-cultivo**

Para el lavado de los presuntos cigotos se empleó, como medio base SOF-HEPES (Apéndice 5); suplementado con 1mM L-Glutamina, 0.3mM Piruvato y 5mg/ml Gentamicina, 4mg/ml PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone), aminoácidos esenciales y no esenciales.

#### **3.3.7. Medio de Cultivo**

Para el cultivo *In vitro* se utilizó como medio base KSOM – AA (Apéndice 6) suplementado con 1mM de L – Glutamina, 0.3mM Piruvato, 5mg/ml Gentamicina, 5mg/ml BSA, 10mM EDTA, aminoácidos esenciales y no esenciales.

### **3.4. Obtención y Clasificación de los ovocitos**

#### **3.4.1. Obtención de ovocitos**

Los ovarios se obtuvieron de alpacas adultas beneficiadas en el camal municipal de Nuñoa – Melgar – Puno, siendo colectados inmediatamente después del sacrificio. Los ovarios fueron colocados en un termo que contenía una solución salina 0.9% (NaCl) como medio de transporte, suplementado con antibiótico y antimicótico, mantenido a una temperatura inicial de 35°C. Los ovarios fueron transportados al Laboratorio de Reproducción Animal – Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en un lapso de tiempo entre 8 – 12 horas para su procesamiento.

Una vez en el Laboratorio, los ovarios fueron lavados en solución salina y limpiados de impurezas. Los complejos cumulus – ovocitos (CCOs) fueron obtenidos mediante aspiración de folículos con un diámetro entre 2 - 6mm con aguja 18G 1 ½ acoplada a una jeringa de 10ml estéril (González, 2001; revisado por Hernández, 2001; Lorenzo 1992). Previo a la punción folicular, se aspiró 0.5ml del medio de lavado pre-maduración para evitar la pérdida de ovocitos en las paredes de la jeringa, debido al tamaño reducido (2.5 x 3.0cm) y a la poca cantidad de líquido folicular en cada folículo.

El líquido folicular obtenido fue depositado en un tubo Falcon de 50ml cubierto con papel aluminio, dejando reposar durante 15 minutos para favorecer a la precipitación del sedimento que contiene a los ovocitos. Transcurrido el tiempo indicado, el sedimento fue aspirado con una pipeta Pasteur y depositado en una placa Petri grande (90x15mm) rayada para facilitar la búsqueda de ovocitos con la ayuda de un Estéreo microscopio (NIKON) a 40X y mantenidos en una platina térmica a 37°C.

Los ovocitos localizados fueron recuperados con una pipeta Pasteur modificada que fue conectada a un rodillo de aspiración, luego fueron colocados en solución de lavado pre-maduración, utilizando placas Petri pequeñas de 35x10mm y realizando un total de 3 lavados. Dicho procedimiento se realizó para eliminar las impurezas que estuviesen adheridas al ovocito antes de haber sido colocadas en el medio de Maduración. El paso de los ovocitos por las distintas placas de lavado se realizó rápidamente, con una permanencia de 5 minutos por placa.

### **3.4.2. Clasificación y selección de ovocitos**

Para efectos del estudio se consideró tomar en cuenta sólo aquellos ovocitos que presentaron el citoplasma homogéneo finamente granulado y uniforme, dicho citoplasma debió llenar por completo el espacio delimitado por la zona pelúcida. Los ovocitos deberán estar cubiertos por uniformes y múltiples números de capas compactas de células del cúmulo. Para la clasificación de los ovocitos se consideró los criterios señalados por Bertoldo *et al* (2010), usando un sistema subjetivo de evaluación, incluyendo los siguientes grados:

- Ovocitos Grado 1: CCOs con más de 3 capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo.

- Ovocitos Grado 2: CCOs con 2 á 3 capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- Ovocitos Grado 3: CCOs parcial o totalmente desnudos, con citoplasma heterogéneo, con presencia de vacuolas.
- Ovocitos Grado 4: CCOs con células del cúmulos expandido en el momento de la aspiración.

Para efectos del estudio, sólo se utilizaron ovocitos de Grado 1 y 2; y no se consideraron ovocitos con un citoplasma retraído, con zona pelúcida rota, células del cumulus expandidas y/o dispersas y con aglutinaciones celulares.

En caso de camélidos, los ovocitos presentan una característica peculiar al de otras especies, con una apariencia oscura en el citoplasma, lo cual ha sido atribuido a la presencia de gotas de lípidos (Del Campo 1994, mencionado por Ratto *et al*, 2005).

### **3.5. Maduración *In vitro***

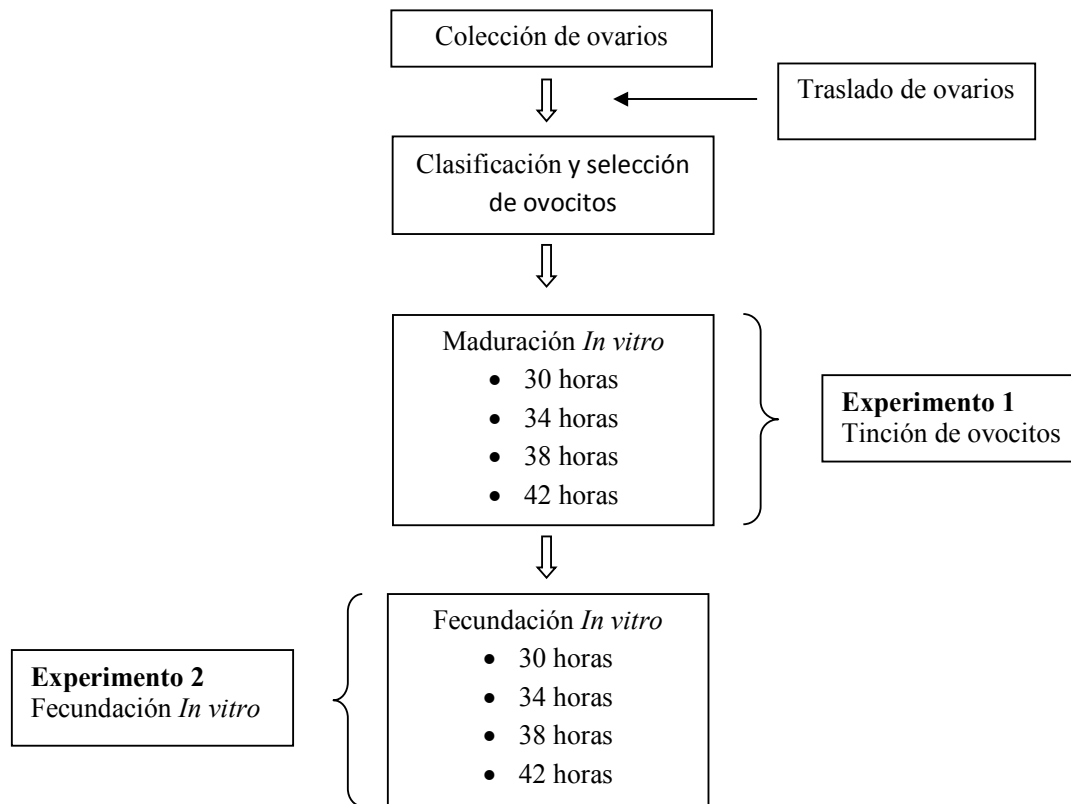
#### **3.5.1 Diseño Experimental**

Para realizar el presente trabajo de investigación, se realizaron 2 experimentos.

Para el experimento 1: se evalúan los tiempos como tratamientos de Maduración *In vitro*, los ovocitos seleccionados y clasificados, en base a los criterios indicados anteriormente, fueron distribuidos al azar a uno de los cuatro tratamientos (tiempos de maduración) en estudio, se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento.

Para el experimento 2: se evalúa la tasa de división de ovocitos pos fecundación a los diferentes tiempos de maduración en estudio, realizando 4 repeticiones por tratamiento. Cada experimento se trabajó de manera independiente.

**Fig. 1 Diseño experimental**



### Experimento 1.

Grupo I (n=118; R=5):	Maduración en TCM-199 por 30 horas.
Grupo II (n=138; R=5):	Maduración en TCM-199 por 34 horas.
Grupo III (n=125; R=5):	Maduración en TCM-199 por 38 horas.
Grupo IV (n=121; R=5):	Maduración en TCM-199 por 42 horas.

### Experimento 2.

Grupo I (n=131; R=4):	División pos fecundación por 30 horas.
Grupo II (n=122; R=4):	División pos fecundación por 34 horas.
Grupo III (n=139; R=4):	División pos fecundación por 38 horas.
Grupo IV (n=141; R=4):	División pos fecundación por 42 horas.



### **3.5.2. Maduración *In vitro***

Para la Maduración, se procedió a preparar el Medio TCM-199 en placas Petri de 60x15 mm. El procedimiento de preparación de las gotas se realizó colocando microgotas de 10µl en la base de la placa Petri, luego se cubrió con aceite mineral y se completó la microgota con 40µl del medio haciendo un total de 50µl por gota. Se prepararon 10 gotas por placa. Una vez realizado dicho procedimiento, la placa fue colocada en la incubadora de CO<sub>2</sub> por lo menos 2 horas antes de ser usada en la Maduración *In vitro*. El procedimiento permite activar, homogenizar y equilibrar el medio de cultivo a las condiciones de la incubadora.

Una vez hallados y clasificados los ovocitos, fueron lavados 3 veces en medio de lavado (pre-maduración) en placas Petri pequeñas, con una duración de 5 minutos en cada una de ellas. Se realizó un último lavado en medio de maduración y se introdujeron en las gotas de maduración TCM-199 con la menor cantidad posible del medio en el que fueron lavados. Por cada gota se colocaron de 10 á 20 ovocitos.

La Maduración *In vitro* se realizó bajo condiciones proporcionadas por una incubadora de CO<sub>2</sub>, con una temperatura de 39°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> y humedad relativa alta, para los distintos tratamientos se usaron 4 tiempos diferentes con intervalos de 4 horas. Siendo estos tiempos 30, 34, 38 y 42 horas de Maduración *In vitro*.

### **3.6. Tinción de ovocitos**

Para determinar el grado de maduración nuclear, una vez cumplidos los tiempos respectivos de maduración descritos en estudio (30, 34, 38 y 42 horas), se procedió a retirar todos los ovocitos y a la observación de los mismos. Los ovocitos fueron colocados en una solución de 300UI/mg Hialuronidasa (Sigma - H3506), suplementada en solución Buffer - PBS (fosfato salino buffer) y 4mg/ml PVP - 40 (Sigma - P0930), contenido en un tubo falcon transparente (250µl de dicha solución de lavado tibio); se eliminaron las células del cúmulo mediante agitación en vórtex a 2000 RPM durante 5 minutos. Se procedió a la recuperación de los ovocitos desnudos con la ayuda de una pipeta Pasteur en una placa Petri y a colocarlos en una solución de fijación conteniendo etanol: ácido acético (3:1) (Sigma - A6283), almacenados a 4°C en refrigeración por un periodo no menor á 36 horas.

Para la evaluación nuclear, se recuperaron todos los ovocitos puestos a madurar, para la tinción se colocaron de 5 á 10 ovocitos por lámina, cubiertos con un cubre objeto sujeto en las cuatro puntas con una mezcla de parafina - vaselina (1:1), se ejerció ligera presión sobre el cubreobjetos hasta entrar en contacto con los ovocitos desnudos, evitando dañarlos. Se agregó la tinción de Orceína (1% de Orceína disuelta en ácido acético al 45%) (Sigma - O7380) durante 2-3 minutos, permitiendo así que la solución penetre entre el porta y cubreobjetos por capilaridad. Posteriormente se sellaron con laca de uñas y se realizó la evaluación mediante microscopio NIKON de contraste de fases a 400X, para determinar la fase de Maduración nuclear en la que se encontraba el ovocito; Vesícula Germinal (GV), Metafase I (MI), anafase-telofase I, Metafase II (MII) y degenerados. Dicho procedimiento se realizó con todos los ovocitos fijados.

Estadio Meiótico	Descripción morfológica
VG	Núcleo intacto. Membrana nuclear presente, cromatina a veces condensada.
Metafase I	Los cromosomas se colocan ordenadamente en la zona ecuatorial, formando el huso acromático.
Anafase-Telofase I	Los cromosomas se separan hacia los polos del huso acromático.
Metafase II	Cromosomas condensados en el segundo huso acromático y presencia del primer corpúsculo polar.
Degenerados	El citoplasma no es homogéneo, presenta condensaciones en toda su superficie.

### 3.7. Fecundación y Cultivo *In vitro*

#### 3.7.1. Fecundación *In vitro*

Para la Fecundación, se procedió a preparar el Medio TL-STOCK en placas Petri de 60x15mm. El procedimiento de preparación de las gotas se realizó colocando microgotas de 10µl en la base de la placa Petri, luego se cubrió con aceite mineral y se completó la microgota con 40µl del medio haciendo un total de 50µl por gota. Se prepararon 10 gotas por placa. Una

vez realizado dicho procedimiento, la placa fue colocada en la incubadora de CO<sub>2</sub> por lo menos 2 horas antes de ser usada en la Fecundación *In vitro*.

Para efectos de la fecundación, se realizó un experimento 2, otro grupo de ovocitos madurados a los diferentes tiempos en estudio, fueron fecundados con espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo. Testículos obtenidos del centro de sacrificio fueron diseccionados para obtener el epidídimo y mantenidos en una solución de PBS y transportados a Lima. La cola del epidídimo fue diseccionada con ayuda de una hoja de bisturí y colocados en una solución de TRIS Buffer para obtener espermatozoides viables. Se utilizó la solución de espermatozoides con una motilidad no menor al 80% antes de la gradiente de Percoll.

La solución de espermatozoides fue colocada en una gradiente discontinua de PERCOLL 22.5/45% y sometida a centrifugación a 700 gravedades por 25 minutos, según el reporte de Khatir y col 2004; Abdoon 2001. Cumplido el periodo de centrifugación, se procedió a retirar el sobrenadante y el pellet formado en la base del tubo, fue reconstituido con 30µl de solución TL-STOCK, quedando listo para su utilización.

Una vez finalizado cada tiempo de maduración en estudio, se procedió a sacar todos los ovocitos de las gotas de maduración y se sometieron a 3 lavados en medio de lavado (pre-fecundación), en placas Petri pequeñas con una duración de 5 minutos en cada una de ellas. Se realizó un último lavado en medio de fecundación y se introdujeron en las gotas de fecundación con la menor cantidad posible del medio en el que fueron lavados. Por gota se colocaron entre 10 á 20 ovocitos, se pre-incubó por 1 hora. Luego se procedió a añadir a cada gota de fecundación 2µl de la suspensión de espermatozoides, 2µl de heparina (1mg/ml) y 2µl de PHE (2mM Penicilamina, 1mM Hipotaurina y 250mM Epinefrina). Se realizó un co-cultivo por 18 horas a una temperatura de 39°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> y humedad relativa alta.

### **3.7.2. Cultivo *In vitro***

Para el Cultivo *In vitro*, se procedió a preparar el Medio KSOM-AA en placas 60x15 mm. El procedimiento de preparación de las gotas se realizó colocando microgotas de 10µl en la base de la placa Petri, luego se cubrió con aceite mineral y se completó la microgota con 30µl del medio haciendo un total de 40µl por gota. Se prepararon 10 gotas por placa. Una vez finalizado el procedimiento, la placa fue colocada en la incubadora de CO<sub>2</sub> por lo menos 12

horas antes de ser usada en el Cultivo *In vitro*. El procedimiento permitió activar, homogenizar y equilibrar el medio de cultivo a las condiciones de la incubadora.

Pasada las 18 horas de Fecundación *In vitro*, se procedió a desnudar a los presuntos cigotos con medio de lavado (pre - cultivo) tibio, eliminándose las células del cúmulo mediante agitación en vórtex a 2000 RPM durante 2 minutos, luego se procedió a la recuperación de los presuntos cigotos desnudos con la ayuda de una pipeta Pasteur en una placa Petri y se procedió a colocar de 20 á 25 cigotos por cada gota. El Cultivo *In vitro* se realizó bajo condiciones proporcionadas por una incubadora de CO<sub>2</sub>, con una temperatura de 39°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> y humedad relativa alta.

La división (2-8 células) fue observada 48 horas después de haber sido pasadas al medio de cultivo (72 horas pos FIV) (Khatir *et al*, 2006a)

### **3.8. Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentajes y distribuidos para cada grupo experimental (horas de maduración). Los datos del estadio en Metafase II, fueron organizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excell 2007, e ingresaron al programa estadístico STATA 10.0 (Stata Corp.) para realizar el análisis respectivo. Los porcentajes de maduración fueron considerados datos continuos debido a que se obtuvieron valores altos. Se realizó un análisis de Varianza para evaluar el efecto de los tratamientos (tiempos de maduración) sobre los porcentajes de maduración de ovocitos. Se realizó un análisis pos hoc de Bonferroni.

## IV. RESULTADOS

### EXPERIMENTO 1

#### 4.1. Tasa de maduración nuclear *In vitro* de ovocitos de alpacas, cultivados a diferentes tiempos.

Los resultados de la maduración nuclear *In vitro* a diferentes tiempos se presentan en el cuadro 1. Según se observa, existe una tendencia decreciente en el porcentaje de ovocitos en Metafase I (fig. 2) y una tendencia creciente en estadios de Metafase II (fig. 3), conforme aumenta el tiempo de maduración. Los más altos porcentajes de ovocitos en estadios de Metafase II se obtuvieron en los grupos III y IV con 68,5% y 75,3% respectivamente, mientras que los menores porcentajes se registraron en los grupos I y II con 26,3% y 52,6% respectivamente. Los resultados señalan que existe una diferencia significativa entre los grupos I, II, respecto a los grupos III y IV ( $p < 0.05$ ), en tanto que no se registra diferencias significativas entre los grupos III y IV.

Así mismo, cuando se observa un mayor porcentaje de ovocitos con maduración nuclear (estadio de Metafase II), también se observa mayor porcentaje de ovocitos degenerados, a excepción del grupo 1 con 15,6% de ovocitos degenerados. Se registro el 1,4%, 4.8% y 12,4% de ovocitos degenerados para los tiempos G-II, G-III y G-IV respectivamente.

**Cuadro 1. Tasa de Maduración Nuclear (Metafase II) de ovocitos.**

<b>Tiempo Maduración</b>	<b>Vesícula Germinal (%)</b>	<b>Metafase I (%)</b>	<b>Anafase-Telofase (%)</b>	<b>Metafase II* (%)</b>	<b>Degenerado (%)</b>
<b>G-I (n=118)</b>	5,3 ±1,26	43,8 ±11,66	9,0 ±13,88	<b>26,3<sup>a</sup> ±5,44</b>	15,6 ±9,99
<b>G-II (n=138)</b>	10,6 ±7,10	23,1 ±8,72	12,4 ±8,0	<b>52,6<sup>b</sup> ±6,7</b>	1,4 ±3,18
<b>G-III (n=125)</b>	6,1 ±6,26	7,9 ±3,32	12,6 ±5,56	<b>68,5<sup>b,c</sup> ±10,55</b>	4,8 ±3,91
<b>G-IV (n=121)</b>	0,0	9,9 ±10,44	2,3 ±2,16	<b>75,3<sup>c</sup> ±11,88</b>	12,4 ±9,48
<b>R = 5 (n=502)</b>	26	111	40	<b>283</b>	42

<sup>a,b</sup> letras diferentes en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.05)

R= número de repeticiones por tratamiento.

\*Estadio de maduración nuclear.

## EXPERIMENTO 2

### 4.2. Tasa de división de ovocitos fecundados y con diferentes tiempos de maduración.

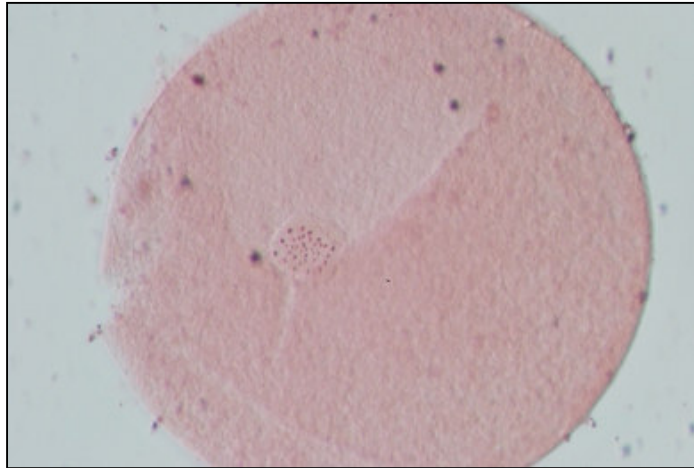
Los resultados de división de ovocitos pos fecundación a diferentes tiempos de maduración se observan en la siguiente cuadro 2. Se puede observar una baja tasa de división de ovocitos a las 72 horas pos fecundación, con un 9,5% y un 8,1% de división a un tiempo de maduración *In vitro* de 30 y 34 horas respectivamente. Pero se observa que a mayor tiempo de maduración se incrementa la tasa de división a las 72 horas pos fecundación, un 15,6% y 19,8% de división a 38 y 42 horas de maduración respectivamente. Al análisis, no se observa diferencia estadística significativa entre los tiempos de maduración respecto a la división pos fecundación.

**Cuadro 2. Tasa de división de ovocitos pos fecundación.**

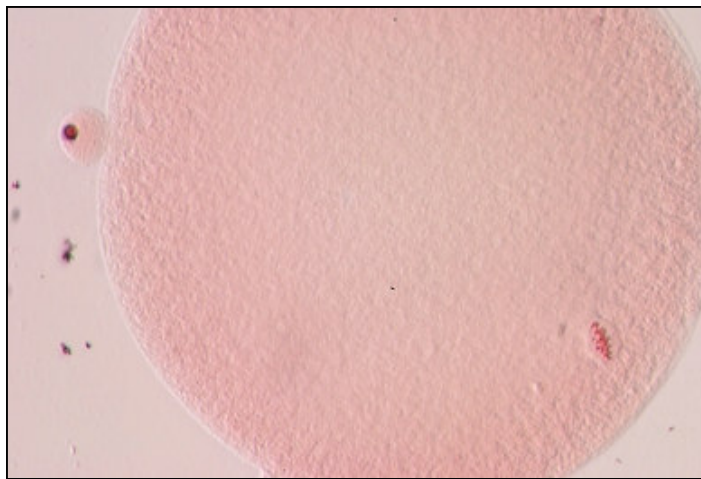
<b>Tiempo de Maduración de ovocitos</b>	<b>% División 72 horas</b>
G-I (n=131)	9,5 <sup>a</sup> ± 4,81
G-II (n=122)	8,1 <sup>a</sup> ± 5,8
G-III (n=139)	15,6 <sup>a</sup> ± 9,2
G-IV (n=141)	19,8 <sup>a</sup> ± 7,97
R= 4 (n=533)	

<sup>a</sup> letras diferentes en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.05)

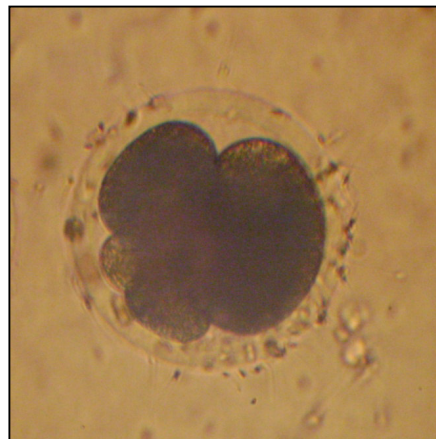
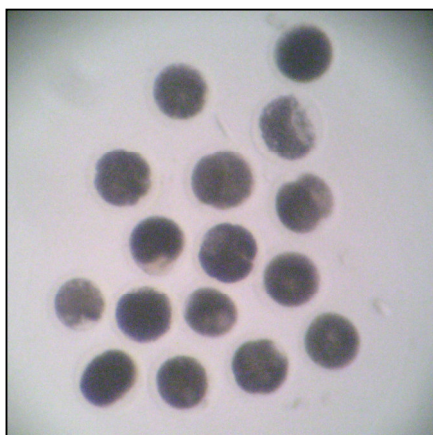
R= número de repeticiones por tratamiento



**Fig. 2 Estadio Metafase I**



**Fig. 3 Estadio Metafase II.**



**Fig. 4 División de cigotos a las 72 horas.**

#### 4.3. Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos utilizados en Maduración *In vitro* de ovocitos de alpacas.

El cuadro 3 muestra la cantidad de ovarios utilizados y la tasa de ovocitos recuperados en el experimento 1 (Maduración *In vitro*). Se realizaron 5 ensayos con un total de 298 ovarios, obteniendo un total 2133 folículos aspirados, con un total 542 COCs de grado 1 y 2, aptos para la maduración, representando un 25,4% (542/2133) de eficacia de obtención de ovocitos de buena calidad, quedando 1591 ovocitos de grado 3 y 4, los cuales no son aptos para ser puestos a madurar, debido a que no poseen las características adecuadas para reanudar la meiosis y alcanzar el estadio de Metafase II. En promedio se recuperaron 7,16 ovocitos por ovario de Grado 1, 2, 3 y 4. Para la valoración de la maduración nuclear mediante fijación y tinción se recuperaron un total de 502 COCs, teniendo una pérdida total de 40 COCs en todos los ensayos al momento de la liberación de las células del cúmulo, fijación y tinción de ovocitos.

**Cuadro 3. Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos.**

Ensayo	Nº ovarios	Nº folículos aspirados	Nº ovocitos/ovarios	Nº ovocitos aptos -grado 1 y 2 (%)	Nº ovocitos no aptos -grado 3 y 4 (%)
E1	60	466	7.76	111 (23.8)	355 (76.2)
E2	66	301	4.56	72 (23.9)	229 (76.1)
E3	68	434	6.38	73 (16.8)	361 (83.2)
E4	45	482	10.71	131 (27.2)	351 (72.8)
E5	59	450	7.6	155 (34.4)	295 (65.5)
<b>TOTAL</b>	<b>298</b>	<b>2133</b>	<b>7.16</b>	<b>542 (25.4)</b>	<b>1591 (74.6)</b>



## V. DISCUSIÓN

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio realizado con el objetivo de determinar los tiempos de cultivo requeridos para obtener ovocitos con maduración nuclear, en estadios de Metafase II, procedentes de ovarios de alpacas sacrificadas. Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan que, a diferencia de otras especies, como bovinos, se requieren entre 38 – 42 horas de maduración para obtener entre el 68,5 - 75,3 % de ovocitos en estadios de Metafase II.

Los procedimientos para el desarrollo de protocolos de fecundación *In vitro* a partir de ovarios procedentes de centros de sacrificio, requieren obtener ovocitos inmaduros a partir de folículos menores de 6mm y que aun no han alcanzado el estadio de folículo pre-ovulatorio. El proceso de maduración de un ovocito en vacunos, requiere un periodo de 3 meses desde el momento que se encuentra en estadios de folículo primordial hasta llegar a folículo preovulatorio. En camélidos no se ha determinado dicho periodo para obtener ovocitos madurados pero se asume que puede ser similar a las otras especies.

Los folículos primordiales contienen un ovocito inmaduro en estadio de Metafase I. Las células germinales primordiales, al igual que las ovogonias, entran en un período de actividad mitótica que se completa generalmente durante la vida fetal en los rumiantes (Hirshfield, 1991; revisado por Van Den Hurk y col, 1997), mientras que en otras especies como el hámster, conejo, gato y cerdo se prolongan hasta después del nacimiento. Tras completar las divisiones mitóticas, las ovogonias se transforman en ovocitos primarios al entrar en el proceso de meiosis. Estas células se bloquean en el diplotene de la profase de la primera división meiótica. Poco después de su formación, los ovocitos primarios se rodean de una capa de células planas,

constituyendo así un folículo primordial, localizados en una posición más cortical dentro del ovario (revisado por Van Den Hurk y col, 1997).

Con la activación e inicio de la foliculogénesis, el folículo primordial adquiere una capa cuboidal de células de la granulosa y se le denomina folículo intermedio, para luego transformarse en folículo primario; esta transformación y posterior crecimiento del folículo puede ocurrir en cualquier momento de la vida de la hembra de los mamíferos, desde el periodo fetal, durante la pubertad, gestación hasta finalizar el período reproductivo (Gordon, 1994). Esto nos indica que para obtener un ovocito maduro se requiere de un tiempo determinado para dicho proceso. El desarrollo de las tecnologías aplicadas a la reproducción como la FIV, reducen el tiempo requerido para la maduración nuclear observada en condiciones *In vivo*. En bovinos y ovinos, se requiere 24 horas para la Maduración *In vitro*, con un porcentaje de ovocitos madurados en estadios de Metafase II, superior al 85% (Van Der Hurk y col. 2005), en cerdas se requiere de un tiempo de 40 horas hallándose más del 75% de ovocitos maduros en Metafase II (Van Den Hurk y col. 2005).

Existen pocos estudios en camélidos sudamericanos y los resultados obtenidos en el presente estudio no pueden ser comparados con reportes previos. Un estudio realizado en llamas reporta una tasa de maduración (ovocitos en Metafase II) del 30.4% después de 30 horas de cultivo (Del Campo *et al*, 1994). Dicho estudio no tuvo como objetivo la determinación del tiempo de maduración indicado, sino que estaba orientado a demostrar la factibilidad de desarrollar un protocolo de fecundación *In vitro* en camélidos así como determinar la capacidad fecundante de espermatozoides obtenidos de epidídimos, que sirvan como base para el desarrollo de protocolos de FIV. Otro estudio realizado por Ratto *et al* (2005) indica un tiempo de maduración *In vitro* de un corto intervalo de 28 horas, obteniendo un 78% de ovocitos en estadio de Metafase II en contraste con estadios tempranos; sin embargo dicho estudio difiere en la aplicación de tratamientos hormonales, previos a la recuperación de ovocitos, induciendo el crecimiento folicular y la consiguiente maduración *In vivo*. Los requerimientos de prolongados tiempos de maduración en los camélidos pueden ser explicados por las características propias de la especie, más aún si son especies de ovulación inducida y que la ovulación *In vivo* ocurre a las 30 horas (Huanca y col, 2001)

Estudios realizados en una especie similar como los camellos y reportados por Abdoon (2001), Khatir *et al* (2004, 2006a y 2006b), Wani y Nowshari (2005), señalan que los ovocitos obtenidos a partir de ovarios procedentes de dromedarios, requieren un tiempo óptimo de

maduración *In vitro* de 36 horas con un rango entre 32- 44 horas de cultivo *In vitro*. Estos tiempos de maduración permiten obtener porcentajes mayores a 75 % de ovocitos madurados en estadios de Metafase II. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados en el estudio e incluso conforme se incrementa los tiempos de maduración, la proporción de ovocitos degenerados se incrementan, similares a nuestros resultados, donde se encontró a las 34, 38 y 42 horas se observa un 1,4%, 4,8% y 12,4% de ovocito degenerados respectivamente. El incremento del porcentaje de ovocitos degenerados puede ser explicado en parte por las condiciones en que se realiza el cultivo, donde se utiliza concentraciones de oxígeno del 20%, con la consiguiente generación de sustancias oxígeno reactivas (ROS).

En lo referente a la recuperación de ovocitos mediante la técnica de aspiración folicular con una aguja N° 18, se ha obtenido 7,16 ovocitos/ovario con una tasa de obtención de ovocitos aptos del 25,4%, similar a lo reportado en camellas por Abdoon (2001), quien reporta la obtención de 5.82, 8.12 y 8.97 folículos por ovario usando el método de aspiración con una aguja de 18, 19 y 20 gauge respectivamente y 10.8 folículos por ovario usando el método de disección, obteniendo mayor cantidad de ovocitos de buena categoría mediante el método de disección (slicing). Estos resultados pueden ser atribuidos a las características del ovario de las alpacas y el método de colección utilizado. Como se observa en el cuadro 3, en los últimos dos ensayos a pesar de contar con una menor cantidad de ovocitos se pudo obtener un mayor número de ovocitos aptos para la maduración debido a que dichos ovarios presentaban características deseables, como ausencia de cuerpos lúteos, folículos menores a 6mm homogéneos y no hemorrágicos. Los resultados sugieren que en futuros trabajos se debería utilizar el método de disección, el cual nos permitirá no solo incrementar el número de ovocitos sino también mejorar la calidad y disminuir la pérdida de ovocitos por manipulación propia del operador al momento de ejercer la fuerza de presión al aspirar los folículos con una aguja de 18 gauge acoplada a una jeringa de 10ml.

Respecto a la tasa de división de ovocitos post fecundación, los resultados del presente estudio son bastante bajos, habiéndose encontrado desde un 8,1% hasta 19,8% de cigotos divididos. Al comparar con los reportes en camellos, existe una diferencia en la tasa de división. Sin embargo estas diferencias pueden ser explicadas por tratarse de especies diferentes, posiblemente algún efecto negativo en la tasa de maduración y a una posible deficiencia en la técnica. Sin embargo, la tendencia en la tasa de división respecto a los tiempos de maduración, se mantienen, observándose un mayor porcentaje de cigotos divididos en los ovocitos madurados a 42 horas, respecto a los ovocitos madurados a 30, 34 y 38 horas.

## VI. CONCLUSIONES

- El tiempo de Maduración *In vitro* de ovocitos procedentes de ovarios de alpacas beneficiadas en camal se encuentra en un rango de 38 y 42 horas, con la obtención de un 68,5% y 75,3% respectivamente.
- La tasa de división de ovocitos fecundados *In vitro*, con espermatozoides obtenidos directamente de epidídimo de machos beneficiados en camal, presenta un 15,6% y 19,8% para las 38 y 42 horas de maduración respectivamente.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Realizar trabajos de investigación en FIV con el uso de la técnica de disección para la recuperación y obtención de ovocitos, porque permitiría obtener un mayor número de ovocitos.
- Se recomienda estudiar el efecto de la suplementación de componentes en los diferentes medios de cultivos y en las diferentes fases, para maximizar las tasas de obtención de blastocistos.
- Utilizar la técnica de FIV en animales vivos de alto valor genético, para contribuir al proceso de la mejora genética en alpacas.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. Aba M, Forsberg M, Kindhal H, Sumar J, Edqvist L, 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta vet. Scand.* 36(4):489-498.
2. Aba M, Kindhal H, Forsberg M, Quiroga M, Auza N, 2000. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F2 $\alpha$  release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim. Reprod Sci.* 59:87-97.
3. Aba M, Sumar J, Kindahl H, Forsberg M y Edqvist LE, 1998. Plasma concentrations of 15 - ketodihydro-PGF (2-alpha), progesterone, estrone sulfate, estradiol - 17 - beta and cortisol during late-gestation, parturition and the early postpartum period in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science.* **50**, 111-121.
4. Abdoon ASS, 2001. Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time in vitro. *Animal Reproduction Science* 66:71-79.
5. Adams GP, 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 90(2):535-45.
6. Adams GP, Griffin PG, Ginther OJ, 1989. *In situ* morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *Biol Reprod.* 41(3):551-8.

7. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH y Ginther OJ, 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fert. **94**, 177-188.
8. Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J, 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. Biol Reprod. 73(3):452-7.
9. Adams GP, Sumar J, Ginther OJ, 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. Anim Reprod Sci. 24:127-138
10. Adams GP, Sumar J, Ginther OJ, 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J Reprod Fertil Suppl.54:17-32.
11. Agüero A, Miragaya MH, Ferrer MS, Capdevielle EF, Chaves MG y Rutter B, 2001. Follicular dynamics in vicuna (*Vicugna vicugna*). Theriogenology. **34**, 1119-1127.
12. Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF, 1992. Pregnancies and live birth from *In vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopy follicular aspiration. Theriogenology 38:667-678.
13. Austin CR, 1992. Observations of the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J Sci. Res., 134, 581, 1951.
14. Baker TG, 1982. Oogenesis and ovulation. Dins: Austin C. R. Short R. V. (eds.) Reproduction in mammals. 1-Germ cells and fertilization. 2º Edición. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 17-45.
15. Bakker J, Baum M, 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. Front Neuroendocrinol. 21(3):220-62.
16. Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL, 1983. Factors affecting successful *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28:717-725.
17. Barnes FL, First NL, 1991. Embryonic transcription *In vitro* cultured bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 29:117-123.

18. Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr, 1992. Development of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. *Theriogenology* 37:127-146.
19. Bazer FW, Geisert RD, Zavy MT, 1993. Fertilization, cleavage and implantation. In: *Reproduction in farm animals*. 6<sup>o</sup> Edición. Hafez ESE (ed). Philadelphia, Pa. USA, Lea & Febiger.
20. Bertoldo M, Holvoake PK, Evans G, Grupen CG, 2010. Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reproduction, Fertility and Development*, 22:122-1229.
21. Betteridge KJ, 1995. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 44:1061-1098.
22. Betteridge and Mitchel D, 1974. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J. Reprod. Fert.* 39: 145-148
23. Blondin P, Sirard MA, 1995. Oocytes and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41; 54-62.
24. Bourke DA, Adam CL, Kyle CE, 1992. Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet Rec.* 9;130(19):424-8.
25. Bourke DA, Kyle CE, Mc Evoy TG, Young O y Adam CL, 1995. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology*, **44**, 255-268
26. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA, 1982. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 27(1):147-158
27. Brackett BG, Zuelke KA, 1993. Analysis of factors involved in the *In vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39:43-64.
28. Bravo PW, Fowler ME, Lasley BL, 1994. The postpartum llama: fertility after parturition. *Biol Reprod.* 51(6):1084-7.



29. Bravo PW, Moscoso J, Ordoñez C, Alarcón V, 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim Reprod Sci.* 43:173-179.
30. Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL, 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol Reprod.* 47(5):884-8.
31. Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME, 1991. The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol Reprod.* 45(4):553-9.
32. Bravo W y Sumar J, 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science.* **21**: 271-281.
33. Bravo W y Varela MH, 1993. Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim. Reprod. Sci.* **32**, 245-252.
34. Bravo WM, Fowler ME, Stabenfeldt GH y Lasley BL, 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology Reproduction.* **43**, 579-585.
35. Briggs D, Miller D, Gosden R, 1999. Molecular biology of female gametogenesis in molecular biology in reproduction medicine. Capítulo 12. Editor in chief Fauser B. C. J. M. The Parthenon Publising Group. Pp 261-262.
36. Canipari R, Palombi F, Riminucci M, Mangia F, 1984. Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Dev Bio.* 102:519-524.
37. Carolan C, Lonergan P, Monniaux D, Mermillod P, 1996. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 43:477-483.

38. Cervantes MP, Huanca W y Huanca T, 2007. Efecto del estadio de desarrollo folicular al momento de la monta sobre la ovulación y sobrevivencia embrionaria en alpacas. Rev. Invest. Vet. Peru. Vol 18 N° 2: 122-128.
39. Chaves MG, Aba M, Agüero A, Egey J, Berestin V, Rutter B, 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. Anim Reprod Sci. 69(1-2):37-46.
40. Chen BX, Yuen ZX y Pan GW, 1985. Semen induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J. Reprod. Fétil. **73**, 335-339.
41. Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF, 1986. *In vitro* studies of the golden hamster sperm acrosoma reaction: completion on the zone pellucidae and induction by homologous soluble zone pellucidae. Develop Biol. 114:119-131.
42. Chian RC, Niwa K, Sirard MA, 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *In vitro*. Theriogenology 41:1499-1508.
43. Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, Rutter B, Pasqualini S, 2007. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. Anim Reprod Sci. 109(1-4):298-308.
44. Crozet N, 1991. La Fécondation *In vivo* and *In vitro*. In: Le reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C.; Levasseur M. C. (eds). INRA-Editions Marketing, Paris, Cap 17, pp. 315-337.
45. Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos M, 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *In vitro*. J. Reprod. Fert. 103:293-298.
46. Crozet N, Dumont M, 1984. The site of the acrosoma reaction during *In vitro* penetration of the sheep oocytes. Gamete Res. 10:97-105.

47. Crozet N, Szöllösi D, 1980. Effect of actinomycin D and  $\alpha$ -amanitin on the nuclear ultrastructure of mouse oocytes. Biol Cell. 38:163-170.
48. Crozet N, Theron MC, Chemineau P, 1987. Ultraestructure of *In vivo* fertilization in the goat. Gamete Res. 18:191-198.
49. Dahlhausen RD, Bonham JB, Meyers G, Ludwick TM, 1981. Characterization and maturation of prepuberal calf follicular oocytes *In vitro*. Theriogenology 15; 111.
50. Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Basile JJ, Robl JM, Duby RT, 1996. Evaluation of developmental competence nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. Mol Reprod Dev. 45:521-534.
51. De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognie Y, 1992. *In vitro* maturation and fertilization in goat oocytes. Theriogenology 37:1049-1060.
52. De Smedt V, Crozet N, Gall L, 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocytes. J Exp Zool. 269:128-139.
53. Del Campo MR, Del Campo CH y Adams GP, 1995a. The application of new reproductive technologies to South American camelids. Theriogenology. **43**, 21-30.
54. Del Campo MR, Del Campo CH y Guinther OJ, 1996b. Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in New World camelids. Theriogenology. **46**, 983-991.
55. Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX y Ginther OJ, 1996a. Recuperación y morfología de ovocitos de llamas (*Lama glama*). I Congreso Mundial sobre camélidos. Cajamarca-Perú. pp: 7.
56. Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ, 1994. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. Theriogenology, 41:1219-1229.

57. Del Campo MR, Del Campo CH, Mapletoft RJ y Guinther OJ, 1995b. Morphology and location of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas. *Theriogenology*. **43**, 533 – 542.
58. Ding J, Moor RM, Foxcroft G, 1992. Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 33:59-66.
59. Downs SM, 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39:65-79.
60. Downs SM, Eppig JJ, 1985. A follicular fluid component prevents gonadotropin reversal of cyclic adenosine monophosphate-dependant meiotic arrest in murine oocytes. *Gamete Res*. 11:83-97.
61. Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM, 1996. Prepuberal calves as oocytes donors promises and problems. *Theriogenology* 45:121-130.
62. England BG, Foote WC, Cardozo AG, Matthews DH, Riera S, 1971. Oestrous and mating behaviour in the llama (*Llama glama*). *Anim Behav*. 19(4):722-6.
63. England BG, Foote WC, Matthews DH, Cardozo AG, Riera S, 1969. Ovulation and corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *J Endocrinol*. 45(4):505-13.
64. Eppig JJ, 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bio Essays* 13:569-573.
65. Eppig JJ, 1993. Regulation of mammalian oocytes maturation. In: *The Ovary* Adashi E. Y. and Leung C. K. (eds) Raven Press, Ltd. New York. pp. 185-205.
66. Eppig JJ, Downs SM, 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocytes maturation. *Biol Reprod*. 30:1-11.
67. Eppig JJ, Downs SM, 1988. Maintenance of oocytes meiotic arrest and the induction of oocytes maturation in mammals. *J Anim Sci*. 66:50-53.

68. Fair T, Hyttel P, Greve T, 1995. Bovine oocytes diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42; 437-442.
69. Fernández - Baca S y Novoa C, 1968. Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre a campo. *A.L.P.A. Memoria.* 3, 7-20.
70. Fernández - Baca S, Hansel W, Novoa C, 1970b. Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod.* 1970 Oct; 3(2):252-61.
71. Fernández - Baca S, Hansel W, Saatman R, Sumar J y Novoa C, 1979. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biol. Reprod.* 20, 586-595
72. Fernandez - Baca S, Madden DH, Novoa C, 1970a. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fertil.* 22(2):261-7
73. Fernández - Baca S, Sumar J, Novoa C, Leyva V, 1973. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. *Rev. Inv. Pec. IVITA. UNMSM.* 2(2):131-135.
74. Freyre G, 2006. Experiencias de transformación y comercialización de la fibra de alpacas. Conferencia Internacional de Camélidos Sudamericanos. 30-31 de Marzo, Arequipa-Perú.
75. Fukushima M, Fukui Y, 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *In vitro*. *Animal Reprod Sci.* 9:323-332.
76. Fulka JJr, Moltlik J, Fulka J, Jilek F, 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J Reprod Fertil.* 77:281-285.
77. Gandolfi F, Luciano AM, Modina S, Ponzini A, Pocar P, Armstrong DT, Lauria A, 1997. The *In vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology* 48:1153-1160.
78. Gordon I, 1982. Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In CE Adams (ed.): "Mammalian Egg Transfer". Boca Raton, FL: CRC Press 63-80.

79. Gordon I, 1990. *In vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova. Embryo Transfer Newsletter 8:6-11.
80. Gordon I, 1994. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon UK: CAB International.
81. Greve T, Madison V, 1991. *In vitro* fertilization in cattle: a review. Reprod Nutr Dev. 31:147-157.
82. Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P, 1987. *In vivo* development of *In vitro* fertilized bovine oocytes matured *In vivo* versus *In vitro*. J. In Vitro Fert Embryo Transfer. 4:281-285.
83. Guilbride PD y Moro M, 1965. Animal Health at high altitude. Veterinarian. Mar; 42:33-8.
84. Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Yurewicz EC, Sacco AG, 1994. Cloning and characterization of zone pellucidae genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC genes families. DNA Seq. 4:361-393.
85. Hashimoto N, Kishimoto T, 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse maturation. Develop. Biol. 126:242-252.
86. Hashimoto S, 2009. Application of *In Vitro* Maturation to Assisted Reproductive Technology. J Reprod Dev. Vol. 55:1-10.
87. Hazelger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS, 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *In vitro*. Theriogenology 43:509-522.
88. Hernández H, 2001. Fertilization *In vitro*. En: Reproducción Bovina. González-Stagnaro C. (ed). Fundación Girar, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI:413-426.
89. Hirshfield A, 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biol Reprod. 44:1157-62.

90. Huanca T y Huanca W, 2003. Effect of GnRH analogous (acetate of buserelina) and double mating on conception rate in llamas. Abstracts of IX World Conference on Animal Production. 26-31 Octubre. Porto Alegre, Brazil. pp: 219.
91. Huanca W y Adams G, 2007. Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. Pag. 869-873. IN: Current therapy in large animal Theriogenology. 2da Ed. Saunders New York USA.
92. Huanca W, Cardenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams G, 2001. Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. Rev Inv Vet. Suplemento 1:462-463.
93. Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cardenas O, Adams GP, Ratto MH, 2009. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. Theriogenology. 72(6):803-8.
94. Huanca W, Palomino J, Cervantes M, Cordero A y Huanca T, 2007. Efecto de temperatura de transporte (35° y 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de camal. Procc. XX Reunión ALPA y XXX Reunión APPA- Cusco. Perú.
95. Hunter AG, Moor RM, 1987. Stage dependent effects of inhibiting ribonucleotic acids and proteins synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. J. Dairy Sci. 70:1646-1651.
96. Hyttel P, Callesen H, Greve T, 1986a. ultrastructural features of preovulatory oocytes maturation in superovulated cattle. J. Reprod. Fertil. 76:645-656.
97. Hyttel P, Callesen H, Greve T, 1989a. A comparative ultrastructural study of *In vivo* versus *In vitro* fertilization of bovine oocytes. Anat Embryo. 179:435-442.
98. Hyttel P, Greve T, Callesen H, 1989b. Ultrastructural aspects of oocytes maturation and fertilization in cattle. J Reprod Fertil. 38:35-47.
99. Hyttel P, Xu KP, Greve T, 1988. Ultrastructural abnormalities of *In vitro* fertilization of *In vitro* matured bovine oocytes. Anat Embryol. 17: 47-52.

100. Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T, 1986b. ultrastructural of in vitro oocytes maturation in cattle. J Reprod Fertil. 78:615-625.
101. Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. 2008. Lima. [Internet], [20 noviembre 2009]. Disponible en <http://www.inei.gob.pe/>
102. Izquierdo D, 1996. Cultivo de embriones caprinos producidos *In vitro*. Universidad Autónoma de Barcelona.
103. Kajihara Y, Blakewood EC, Myers MW, Kometani, Goto K, Godke RA, 1991. *In vitro* maturation of follicular oocytes obtained from calves. Theriogenology 35(1):220.
104. Karp G, 1996. Biología Celular y Molecular. McGraw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V. México D. F. 580-626.
105. Kenkistepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Brackett BG, 1994. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *In vitro*. Theriogenology 42:527-535.
106. Khatir H, Anouassi A, 2006. The first dromedary (*Camelus dromedarius*) offspring obtained from *In vitro* matured, *In vitro* fertilized and *In vitro* cultured abattoir-derived oocytes. Theriogenology 65:1727-1736.
107. Khatir H, Anouassi A, Tibary A, 2004. Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. Theriogenology 62:1175-1185.
108. Khatir H, Anouassi A, Tibary A, 2006a. Effect of follicular size on *In vitro* developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). Animal Reproduction Science; doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.06.015.
109. Khatir H, Anouassi A, Tibary A, 2006b. Quality and developmental ability of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos obtained by IVM/IVF, *In vivo* matured/IVF or *In vivo* matured/fertilized oocytes. Reprod Dom Anim; doi: 10.1111/j. 1439-0531.2006.00775.x



110. Kruip TAM, Pieterse MC, Van Beneden TH, Dieleman SJ, 1983. Structural changes in bovine during final maturation *In vivo*. Gamete Res. 8:29-47.
111. Kruip, TAM, Van Reenen CG, 2001. Biotechnology of Reproduction and farm Animals Welfare. In: Sustainable Animal Production: Conference, Workshops, Discussion. Research Consortium Animal Production. <http://www.agriculture.de>
112. Kumar J, Osborn JC, Cameron Awn, Batt PA, Trounson AO, 1990. Premature condensation of chromatin induced in goat (*Capra hircus*) oocytes after gonadotrophin treatment. Reprod Fert Develop. 2:661-670.
113. Kurpisz M, 1993. Molecular basis for sperm-oocyte interaction. Folia Histochemica et Cytobiologica 31:103-108.
114. Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S, 1997. Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. J. Reprod. Fert. 109:73-78.
115. Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S, 1999. Follicular size affects the meiotic competence of *In vitro* matured prepubertal and adult oocyte in sheep. Reprod. Nutr. Dev. 39:503-508.
116. Leibfried – Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL, 1987. Development potential of bovine oocytes matured *In vitro* or *In vivo*. Biol Reprod. 36(2):376-83.
117. Leibfried ML, First NL, 1980. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *In vitro*. Biol Reprod. 23:699-704.
118. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I, 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and cultura *In vitro*. Mol Reprod Dev. 37:48-53.

119. Lonergan P, Vergos E, Kinis A, Sharif H, Gallagher M, Gordon Y, 1991. The effect of recovery method on the type of oocytes obtained for *In vitro* maturation. *Theriogenology* 35:231.
120. López A, Huanca W, Leyva V, 2006. Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal de llama, alpaca y toro. *Rev Inv Vet*. Vol 17 N°2 pp. 114-18.
121. Lorenzo GP, 1992. Maduración *In vitro* de oocitos de ganado vacuno. Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
122. Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H, 1988. Birth of twins after of cattle embryos produced by *In vitro* techniques. *The Vet. Record* 122; 539-540.
123. Lu KH, Gordon I, Gallagher M, McGovern H, 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *In vitro* fertilization of oocytes matured *In vitro*. *The Vet. Record* 121:259-260.
124. Martino A, Mogas T, Palomo M, Paramio MT, 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 41:969-980.
125. Martino A, Mogas T, Palomo M, Paramio MT, 1995. *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43:473-485.
126. Mattioli M, Galeati G, Bacci ML, Barboni B, 1991. Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes through maturation. *Molecular Reprod Develop.* 30:119-125.
127. McGaughey RW, Polge C, 1971. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *In vitro*. *J. Exp. Zool.* 176:386.
128. McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White R, Saling PM, 1998. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int Rev Cytol.* 177:57-113.

129. Mermillod P, Oussaid B, Cognié, 1999. Aspects of follicular and oocytes maturation that affect the development potential of embryos. J Repro Fert. Supple, 54:449-460.
130. Miragaya MH, Aba MA, Capdevielle EF, Ferrer MS, Chaves MG, Rutter B, Agüero A, 2004. Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). Theriogenology, Feb; 61(4):663-71.
131. Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A, 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. Small Ruminant Research, 61(2-3):299-310.
132. Mogas T, 1994. Productió *In vitro* d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis doctoral, Universidad Autònoma de Barcelona.
133. Moor RM, Crosby IM, 1986. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. J Embryol Exp Morph. 94:207-220.
134. Moor RM, Gandolfi F, 1987. Molecular and celular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. J Reprod Fertil Supplement. 40:197-210.
135. Moor RM, Osborn JC, Cran DG, Walters DE, 1981. Selective effects of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. J Embryol Exp Morph. 61:347-365.
136. Moor RM, Trounson AO, 1997. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *In vitro* and their subsequent developmental capacity. J Reprod Fert. Suppl. 38:17-25.
137. Motlik J, 1989. Cytoplasmic aspects of oocytes growth and maturation in mammals. J Reprod Fert. Suppl. 38:17-25.
138. Naito K, Hawkins C, Yamashita, 1995. Association of p34cdc2 and cyclin B1 duringg meiotic maturation in porcine oocytes. Dev Biol. 168:627-634.
139. Nicholas F, 1996. Genetic improvement through reproductive technology. Anim Reprod Sci. 42:205-214.

140. Novoa C, 1970. Reproduction in Camelidae. J Reprod Fertil. 22(1):3-20.
141. Novoa C, Fernández - Baca S, Sumar J, Leyva V, 1972. Pubertad en la alpaca. Rev Inv Pec. IVITA. UNMSM. 1:29-35.
142. O'Rand MG, 1988. Sperm-egg recognition and barriers to interspecies fertilization. Gamete Res. 10; 315-328.
143. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikama S, Susuki T, 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. Theriogenology 48; 769-774.
144. Palma GA, Clement - Sengewald A, Krefft H, 1993. *In vitro* production of cattle embryos from calf oocytes. Theriogenology 39; 278.
145. Parrish JJ, Kim CI, Bae IH, 1992. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocytes maturation, fertilization and embryo development. Theriogenology 38:277-296.
146. Pavlok A, Lucas - Hahn A, Niemann H, 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev. 31:63-67.
147. Phillips DM, Shalgi R, 1982. Sperm penetration into rat ova fertilized *In vivo*. J. Exp Zool. 221:373-378.
148. Pinyopummintr T, Bavister BD, 1995. Optimum gas atmosphere for *In vitro* maturation and *In vitro* fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 44:471-477.
149. Plachot M, Mandelbaum J, 1990. Oocytes maturation, fertilization and embryonic growth *In vitro*. British Medical Bulletin 46(3):675-694.
150. Prather RS, Day BN, 1998. Practical considerations for the *In vitro* production of pig embryos. Theriogenology 49(1):23-32.

151. Procházka R, Motlik J, Fulka J, 1989. Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cell Differentiation Develop.* 27:175-182.
152. Racowsky C, 1991. Gamete resources: Origin and production of oocytes. In: Pdersen RA, McLaren A, First NL, (Ed) *Animal applications of research in mammalian development*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 23-82
153. Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP, 2005. *In vitro* and *In vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 63(9):2445-57.
154. Ratto M, Huanca W, Adams G, 2010. Ovulation-inducing factor: A protein component of llama seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinology*. 8:94.
155. Ratto M, Huanca W, Singh J y Adams GP, 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal. Reproduction Science*. **91** (3-4), 299-306.
156. Ratto MH, Gatica R y Correa JE, 1997. Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*. **48**, 325-330.
157. Ratto MH, Singh J, Huanca W, Adams GP, 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60(9):1645-56.
158. Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y, 1993. *In vitro* production of blastocysts from calf oocytes. 9ºReunión AETE Lyon, 270.
159. Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y, 1995. Low developmental capacity of *In vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil*. 103:115-120.
160. Rieger D, Loskutoff NM, 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *In vitro*. *J Reprod Fertil*. 100(1):257-262.

161. Sadler TW, 1996. Langman embriología Médica. Edit. Médica Panamericana, S. A. Madrid, España.
162. Sagata N, 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanism and biological significance. Trends Cell Biol. 6:22-28.
163. San Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodriguez R, Bustinza G, Acosta L, 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. J Reprod Fertil. 16(3):395-9
164. Sato E, Ishibashi T, 1997. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulose cells. Jpn. J Zootech Sci. 48:22-26.
165. Shalgi YR, Phillips D, 1980. Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. J Ultrastruct Res. 71:154-161.
166. Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S, 1992. Effect of fresh or culture follicular fractions on meiotic in bovine oocytes. Theriogenology 37:39-57.
167. Sirard MA, First NL, 1988. *In vitro* inhibition of oocytes nuclear maturation in the bovine. Biol Reprod. 39:229-234.
168. Skidmore J, Starbuck G, Lamming G, Allen W, 1998. Control of luteolysis in the one-humped (*Camelus dromedarius*). J Reprod Fertil 114(2):201-209.
169. Skidmore JA, Billah M y Allen WR, 1996. Patterns of hormone secretion throughout pregnancy in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). J. Reprod. Fertil. **8**, 863-869.
170. Smith PM, 1985. Ovulation induction. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs. 14(6 Suppl):37-43.
171. Staigmiller, RB, 1988. *In vitro* methods for production of viable oocytes. J Anim Sci. 66(2):54-64.
172. Sumar J y Bravo PW, 1991. In situ observation of the ovarian of llamas and alpacas by use of a laparoscopic technique. J. Anim. Vet. Med. Assoc. **199**, 1159-1163.

173. Sumar J, 1985. Reproductive physiology in South American camelidae. In: Genetics of Reproductive in sheep. Edit by Land, R; Robinson, S London: Butterworths. P 81-95.
174. Sumar J, 1988. Renoval of the ovarios or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. Acta Vet. Scand. **83**, 133-14.
175. Sumar J, 1996. Reproduction in llamas and alpacas. Anim. Reprod. Sci. **42**, 405-415.
176. Sumar J, 2000. Llamas and Alpacas. In: Reproduction in farm animals. Edit by Hafez, ESE. 7° edition. USA pp. 218-228.
177. Sumar J, 2007. Realidades y mitos en los camélidos sudamericanos. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (APPA) XXX Reunión Asociación peruana de Producción Animal (APPA). V Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. 21-25 Octubre. Memoria. Cuzco-Perú.
178. Sumar J, García M, 1985. Diagnóstico precoz de gestación en alpacas basado en niveles de progesterona de la leche. Estudio preliminar. En: V Convención Internacional sobre Camélidos sudamericanos. Libro de resúmenes. Cusco. pp. 22.
179. Sutovsky P, Flechon JE, Flechon B, Motlik J, Peynot N, Chesne P, Heyman Y, 1993. Dynamic changes of gap junction and cytoskeleton during *In vitro* culture of cattle oocytes cumulus complexes. Biol Reprod. 49:1272-1287.
180. Suzuki H, Yang X, Foote RH, 1994. Surface characteristics and size changes of immature, *In vitro* matured and *In vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology 41:307.
181. Szöllösi D, 1993. Oocyte Maturation. In: Thibault C.; Levasseur M. C.; Hunter R. H., eds. Reproduction in Mammals and Man. Paris: Ellipses, 307-325.
182. Talansky BE, Malter HE, Choen J, 1991. A preferential site for sperm-egg fusion in mammals. Mol Reprod Dev. 28:183-188.
183. Tan SJ, Lu KH, 1990. Effect of different oestrous stages of avaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *In vitro*. Theriogenology 33:335.

184. Thibault C, Szöllosi D, Gerard M, 1987. Mammalian oocytes maturation. *Reprod Nutr Dev.* 27:865-896.
185. Tibary A, Anouassi A, 2001. Retrospective study on an unusual form of ovario-bursal pathology in the camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 1;56(3):415-24.
186. Toner H, Alm H, Goristanov Y, 1992. IVM/IVF of calf oocytes. *Proc 12<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague* 1:381-383.
187. Trounson A, 1992. The production of ruminant embryos *In vitro*. *Anim Reprod Sci.* 28:125-137.
188. Tsafiriri A, Chaning CP, 1975. An inhibitory influence of granulose cells and follicular fluid upon porcine meiosis *In vitro*. *Endocrinology* 96:922-927.
189. Van Den Hurk R and Zhao J, 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717 – 1751.
190. Van Den Hurk R, Beckers JF, Bevers MM, 1997. *In vivo* and *In vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology* 47(1):73-82.
191. Vanderhyden B, Armstrong D, 1989. Role of cumulus cells and serum on the *In vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 40:720-728.
192. Vásquez M, Cervantes M, Cordero A, Cárdenas O, Huanca T, Huanca W, 2007. Vitricación de embriones de alpacas: estudio preliminar. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol 15 (Supl. 1) pp. 349.
193. Vaughan JL, Macmillan KL, Anderson GA, D'Occhio MJ, 2003. Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Aust Vet J.* 81(1-2):86-90.
194. Vaughan JL, Macmillan KL, D'Occhio MJ, 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim Reprod Sci.* 80(3-4):353-61.



195. Wani NA, Nowshari MA, 2005. Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on *In vitro* maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology*. 64:75-85.
196. Wassarman PM, 1988. Zone pellucide glycoproteins. *Ann Rev Biochem*. 57:415-442.
197. Wassarman PM, 1990. Profile of a mammalian sperm receptor. *Development*. 108:1-17.
198. Xu KP, Greve T, 1988. A detailed analysis of early events during *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fert*. 82:127-134.
199. Yanagimachi R, 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and embryonic development In vitro*. Mastroianni L.; Biggers J. D. (eds) Plenum Publishing Corporation. pp. 81-155.
200. Yanagimachi R, 1988. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, Vol 1. Knobil E.; Neil J. D. (eds.) Raven Press, Ltd., New York. pp. 135-185.
201. Yanagimachi, 1994. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, 2º Edición. Knobil E.; Neil J. D. (eds.) Raven Press, Ltd., New York

## **IX. APÉNDICE**

**APÉNDICE 1.** Composición de TL-HEPES

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl	114
KCl	3.2
NaHCO <sub>3</sub>	2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34
HEPES	10
Ácido Láctico	10
Rojo Fenol	
*CaCl <sub>2</sub> stock	
*MgCl <sub>2</sub> stock	

**APÉNDICE 2.** Composición M-199 Cell Culture Tested.

Components	g/L	Components	g/L
Calcium Chloride Anhydrous	0.2	Choline Chloride	0.0005
Ferric Nitrate 9 H <sub>2</sub> O	0.00072	Folic Acid	0.00001
Magnesium sulfate	0.09767	Menadione	0.000016
Potassium Chloride	0.4	Myo-Inositol	0.00005
Sodium Acetate	0.05	Niacinamide	0.000025
Sodium Phosphate Monobasic	0.122	Nicotinic Acid	0.000025
L-Alanine	0.025	p-Aminobenzoic Acid	0.00005
L-Arginine HCl	0.07	D-Pantothenic Acid	0.00001
L-Aspartic Acid	0.03	Pyridoxal HCl	0.000025
L-Cysteine HCl H <sub>2</sub> O	0.00011	Pyridoxine HCl	0.000025
L-Cystine 2HCl	0.026	Retinol Acetate	0.00014
L-Glutamic Acid	0.0668	Rivoflavin	0.00001
L-Glutamine	0.1	(+,-) - Tocopherol Phosphate 2Na	0.00001
Glycine	0.05	Thiamine HCl	0.00001
L-Histidine HCL H <sub>2</sub> O	0.02188	Adenine Hemisulfate	0.01
Hydroxy-L-Proline	0.01	Adenine 5'-Triphosphate 2Na	0.001
L-Isoleucine	0.02	Adenosine 5'-Monophosphate Na	0.0002385
L-Leucine	0.06	Cholesterol	0.0002
L-Lysine HCL	0.07	2-Deoxy-ribose	0.0005
L-Methionine	0.015	Glucose	1.0
L-Phenylalanine	0.025	Glutathione	0.00005
L-Proline	0.04	Guanine HCl	0.0003
L-Serine	0.025	HEPES	5.958
L-Threonine	0.03	Hypoxanthine	0.0003
L-Tryptophan	0.01	Phenol Red Na	0.0213
L-Tyrosine 2Na 2H <sub>2</sub> O	0.05766	Polyoxythylenesorbitan Monooleate	0.02
L-Valine	0.025	Ribose	0.0005
L-Ascorbic Acid Na	0.00005666	Thymine	0.0003
D-Biotin	0.00001	Uracil	0.0003
Ergocalciferol	0.0001	Xanthine Na	0.000344

**APÉNDICE 3.** Composición del medio TCM-199

Componente	
M – 199	0.99gr.
NaHCO <sub>3</sub>	0.22gr.
Agua Milli Q (ultra pura)	

**APÉNDICE 4.** Composición de TL-STOCK

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114
KCl	3.2
NaHCO <sub>3</sub>	25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34
Ácido Láctico	10
Rojo Fenol	
*CaCl <sub>2</sub> – Stock	2
*MgCl <sub>2</sub> – Stock	0.5

**APÉNDICE 5.** Composición de SOF-HEPES Stock

Componente	Concentración (mM)
NaCl	107.7
KCl	7.16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
Ácido Láctico	3.30
*CaCl <sub>2</sub> – Stock	1.71
*MgCl <sub>2</sub> – Stock	0.49
HEPES	
BSA	
Piruvato	0.3
Gentamicina	

## APÉNDICE 6. Composición de KSOM-STOCK

Componente	Concentración (mM)
NaCl	95
KCl	2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
SO <sub>4</sub> Mg7H <sub>2</sub> O	
Glucosa	
Rojo Fenol	
Ácido Láctico	
*CaCl <sub>2</sub> – Stock	1.71

Todos los materiales utilizados se esterilizaron mediante autoclave (calor seco y/o calor húmedo) o bajo luz UV. Los ingredientes que componen los medios de cultivos se pesaron en una balanza analítica de precisión (Sartorius). Para la preparación de los medios de cultivos se empleó agua ultrapura (Sigma W3500) y para el lavado del material se usó agua bidestilada (Trifarma).

El ajuste del pH de los medios se realizó con un potenciómetro (HANNA). El suero sanguíneo utilizado en los medios de cultivo, tal como el suero fetal bovino (SFB, Sigma-F7524) fue inactivado por calor a baño maría (GEMMYCO), a 56°C durante media hora. Este procedimiento tiene como objetivo desactivar ciertas proteínas del complemento que tienen efectos negativos en los sistemas de cultivo *In vitro*.

**APÉNDICE 7. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EVALUAR EL EFECTO DE LOS TIEMPOS SOBRE LOS PORCENTAJES DE MADURACIÓN DE OVOCITOS.**

FUENTE	GRADO DE LIBERTAD	SUMA CUADRADO	CUADRADO MEDIO	VALOR DE F	PROB > F
Modelo	3	7105.796	2368.599	28.96	0.0001
Tratamientos	3	7105.796	2368.599	28.96	0.0001*
Residuo	16	1308.472	81.7795		
TOTAL	19	8414.268	442.856		

\*Valor estadísticamente significativo

**APÉNDICE 8. TABLA DE COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS**

ESTADÍO					
TIEMPOS	VESÍCULA GERMINAL	METAFASE 1	ANA-TELOFASE 1	METAFASE 2	TOTAL
30 h	6	55	8	31	100
	6.00	55.00	8.00	31.00	100.00
34 h	13	35	14	74	136
	9.56	25.74	10.29	54.41	100.00
38 h	7	9	15	88	119
	5.88	7.56	12.61	73.95	100.00
42 h	0	12	3	90	105
	0.00	11.43	2.86	85.71	100.00
TOTAL	26	111	40	283	460
	5.65	24.13	8.7	61.52	100.00

Pearson chi2 (9) = 105.7312    Pr = 0.0001

**APÉNDICE 9. TABLA DE COMPARACIÓN DE MADURACIÓN POR TRATAMIENTO**  
(Bonferroni)

	<b>30 horas</b>	<b>34 horas</b>	<b>38 horas</b>
<b>34 horas</b>	26.26 0.002		
<b>38 horas</b>	42.22 0.000	15.96 0.079	
<b>42 horas</b>	48.96 0.000	22.7 0.007	6.74 1.000

Nivel de significancia,  $P < 0.05$